

# **Intrazellulärer Transport von Ziliun-assoziierten Proteinen**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
- Biologie und Vorklinische Medizin -  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Sonja Gürster**  
aus Regensburg

Februar 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:  
06.02.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:  
Prof. Dr. Ralph Witzgall

Unterschrift

---

Sonja Gürster

Meiner Familie  
in Liebe und Dankbarkeit

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Mögliche getan hat.

[J. W. v. Goethe, *Italienische Reise*, 1787]



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Polyzystische Nieren</b>	<b>1</b>
1.1	Autosomal-dominante Form der polyzystischen Nierenerkrankung	2
1.2	Polycystin-2	3
1.2.1	Lokalisation und Funktion von Polycystin-1 und Polycystin-2	3
1.2.2	Polycystin-2 fungiert als nicht-selektiver Kationen-Kanal	4
1.2.3	Intrazelluläre Lokalisation von Wildtyp-Polycystin-2 und seiner Mutanten	4
<b>2</b>	<b>Primäres Zilium</b>	<b>6</b>
2.1	Funktion und Aufbau des primären Ziliums	7
2.2	Basalkörperchen	9
2.3	Hypothetische Funktionen der strukturellen Hauptbestandteile	10
2.3.1	„Übergangsfasern“ (Transition fibers bzw. Alar sheets)	12
2.3.2	„Basale Füßchen- und Kappenstrukturen“ ( <i>Basal feet and caps</i> )	13
2.3.3	„Gestreifte Wurzelfasern“ ( <i>Striated rootlets</i> )	13
<b>3</b>	<b>Transport von Membranproteinen</b>	<b>13</b>
3.1	Intraflagellarer Transport (IFT)	14
3.2	Transport von Membranproteinen in das primäre Zilium	14
<b>4</b>	<b>Live cell imaging und Elektronenmikroskopie – kein Widerspruch</b>	<b>17</b>
4.1	<i>In-vivo</i> -Färbung mittels FAsH	18
4.2	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH	18
<b>5</b>	<b>3D-Visualisierung mittels Elektronentomographie von hochdruckgefrorenen Proben</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>1</b>	<b>Materialien</b>	<b>21</b>
1.1	Chemikalien	21
1.2	Molekularmassenstandards	22
1.3	Enzyme/kommerzielle Puffer	23
1.4	Antikörper	24
1.5	DNA	24
1.5.1	Vektoren und Plasmid-DNA-Konstrukte	24
1.5.2	Oligonukleotide	26
1.6	Zellen	27

1.6.1	Bakterien	27
1.6.2	Immortalisierte Säuger-Zelllinien	27
1.7	Kits	28
<b>2</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Aufreinigung von Plasmiden	29
2.1.1	Plasmid-DNA-Minipräparation aus <i>E. coli</i>	29
2.1.2	Plasmid-DNA-Midipräparation aus <i>E. coli</i>	30
2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.3	Agarosegelelektrophorese	31
2.3.1	Elektroelution	32
2.4	Arbeiten zur Klonierung	32
2.4.1	Aufkonzentrierung von DNA	32
2.4.2	Restriktionsverdau von DNA	33
2.4.3	Herstellung von „glatten Plasmid-DNA-Enden“	33
	Klenow DNA Polymerase	34
	T4 DNA Polymerase	34
2.4.4	Dephosphorylierung von Vektor-DNA mittels bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP)	35
2.4.5	Ligation	35
	Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden	36
	Ligation von glatten Enden	36
2.4.6	Sequenzierung	36
2.5	Arbeiten mit Bakterien	37
2.5.1	Kultivierung und Lagerung	37
2.5.2	Herstellung kompetenter Zellen	37
	TSS-Protokoll (Chung et al., 1989)	37
	Elektrokompetente Zellen	38
2.5.3	Transformation von Bakterien	38
	TSS-Protokoll (Chung et al., 1989; Hanahan et al., 1983)	38
	Elektroporation	39
2.6	Arbeiten mit immortalisierten Zelllinien	39
2.6.1	Kultivierung und Passagieren	39
	Auftauen von Zellen	40
	Kultivieren und Passagieren von Zellen	40
	Einfrieren von Zellen	41
2.6.2	Plasmid-DNA Transfektion von Zellen	41
	Transiente Transfektion mit Lipofectamine™ 2000	41
	Transiente Transfektion mit DEAE-Dextran	42
	Stabile Transfektion	43
2.6.3	Induktion der Proteinproduktion bei stabil transfizierten Zellen	45
2.6.4	Herstellen von Ganzzell-Lysat zur Proteinextraktion	45
2.6.5	Immunzytochemie	46

2.6.6	<i>In-vivo</i> -Färbung mittels FLAsH	47
<b>3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>48</b>
3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.2.1	Herstellung der Gele	49
3.2.2	Probenvorbereitung	50
3.2.3	Elektrophoresebedingungen	50
3.3	Western-Blot	50
3.3.1	Elektroblot von Proteinen auf PVDF-Membran	50
3.3.2	Immunologischer Nachweis	51
<b>4</b>	<b>Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden</b>	<b>52</b>
4.1	Konventionelle Präparation der Zellen	54
4.1.1	Zellkultur	54
4.1.2	Chemische Fixierung	54
4.1.3	Nachfixierung und Kontrastierung	55
4.1.4	Entwässerung	55
4.1.5	Infiltrierung und Einbettung in Kunstharz	56
4.2	Kryo-Präparation der Zellen	58
4.2.1	Vorbereitung	59
	Reinigung der Saphirplättchen	59
	Beschichtung der Saphirplättchen	59
4.2.2	Zellkultur	59
4.2.3	Hochdruckgefrieren	60
4.2.4	Gefriersubstitution mit chemischer Fixierung	61
	Standardprogramm	62
	Verkürztes Programm	62
4.2.5	Infiltration und Einbettung in Epon	62
4.3	Ultramikrotomie	63
4.3.1	Entfernen der Aufwachsmaterialien von eingebetteten Zellen	64
	Ablösen der $\mu$ -Dishes	64
	Absprengen der Träger inkl. Saphirplättchen	64
4.3.2	Trimmen der Kunststoff-Blöckchen	64
4.3.3	Vorbereitung der Grids	65
4.3.4	Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten	65
	Herstellung von Serienschnitten	66
4.3.5	Kontrastierung und Färbung von Schnitten	66
	Kontrastierung von Ultradünnschnitten	66
	Färbung von Semidünnschnitten	67
<b>5</b>	<b>Mikroskopie</b>	<b>67</b>

5.1	Lichtmikroskopie	67
5.2	Fluoreszenzmikroskopie	68
5.3	Elektronenmikroskopie	68
<b>6</b>	<b>Elektronen-Tomographie</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>3D-Rekonstruktion mit IMOD</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>3D-Modelle – Visualisierung der rekonstruierten elektronentomographischen Datensätze</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie</b>	<b>69</b>
9.1	Klonierung von TC-Konstrukten	70
9.2	Zellkultur	70
9.3	ReAsH-Färbung: Tetracystein-basierte Proteindetektion	71
9.4	Photokonversion mit Diaminobenzidin (DAB)	72
9.5	Nachfixierung und Kontrastierung mit OsO <sub>4</sub>	73
9.6	Entwässerung, Infiltration und Einbettung in Epon/Durcupan	74
9.7	Ultramikrotomie	74
9.8	Elektronenmikroskopie	75
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>Etablierung der Tetracystein-basierten Protein-Detektionsmethode mittels FIAsh™ und ReAsH™</b>	<b>76</b>
1.1	Generierung stabiler Zelllinien für die Tetracystein-basierte Proteindetektion	77
1.2	Tetracystein-basierte Proteindetektion mittels FIAsh™	80
1.3	Tetracystein-basierte Proteindetektion mittels ReAsH™	82
<b>2</b>	<b>Etablierung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH™</b>	<b>83</b>
2.1	Transiente Protein-Expression für die Tetracystein-basierte Detektion mittels ReAsH™	83
2.2	Golgi-Transport und Zytoplasmamembran-Lokalisation	84
2.2.1	Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante	85
2.2.2	Polycystin-2-Triple-Alanin-Mutanten	88
2.2.3	Volllängen-Polycystin-2	91
2.3	Zilien-Transport	94
2.3.1	Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante	94
<b>3</b>	<b>Morphologische Charakterisierung des primären Ziliums</b>	<b>97</b>
3.1	Darstellung der Basis von primären Zilien nach chemischer Fixierung	98
3.1.1	TEM-Tomographie von konventionell präparierten Nierenepithelzellen	99
3.2	TEM-Untersuchungen von 200 nm-Semidünnschnitten von hochdruckgefrorenen, gefrier substituierten Nierenepithelzellen	100
3.3	3D-Rekonstruktionen von hochdruckgefrorenen, gefriersubstituierten Nierenepithelzellen	103
3.4	3D-Visualisierungen anhand TEM-tomographischer Aufnahmen	108

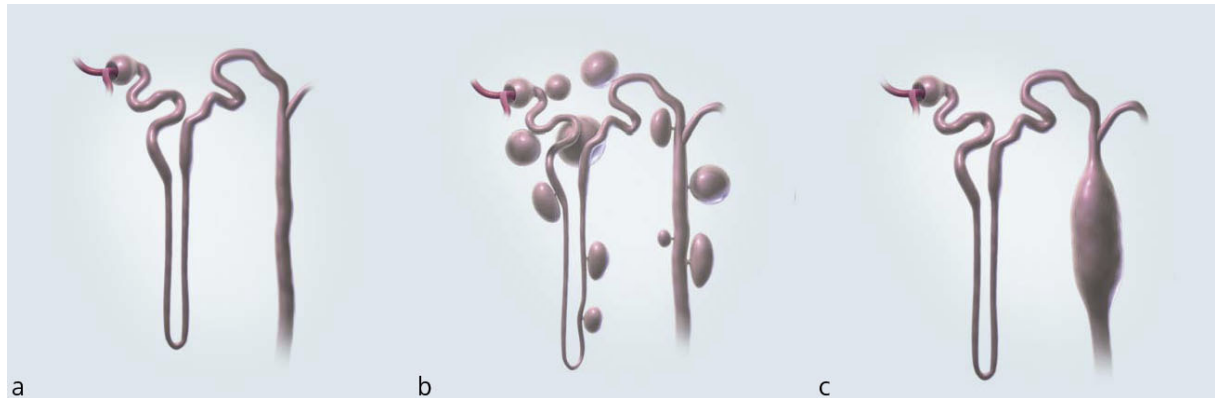
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>112</b>
<b>1</b>	<b>Diskussion der angewandten transmissionselektronenmikroskopischen Methoden</b>	<b>113</b>
1.1	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie	113
1.2	Tomographie	117
1.3	Kryo-Fixierung und Gefriersubstitution	118
1.4	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse	119
<b>2</b>	<b>Diskussion der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse</b>	<b>121</b>
2.1	Transport des integralen Membranproteins Polycystin-2	121
2.1.1	Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante	122
2.1.2	Polycystin-2-Triple-Alanin-Mutanten	124
2.1.3	Volllängen-Polycystin-2	125
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>128</b>
<b>VI</b>	<b>ANHANG</b>	<b>130</b>
<b>1</b>	<b>Beispiel zur Wiederfindung von ReAsH-photokonvertierten Zellen</b>	<b>130</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>3</b>	<b>Ordnerstruktur der Begleit-CD</b>	<b>135</b>
<b>VII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>136</b>
<b>VIII</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>153</b>
<b>IX</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>154</b>

---

# I Einleitung

## 1 Polyzystische Nieren

Eine Reihe von Erkrankungen der Nieren beinhaltet das Krankheitsbild von polyzystischen Veränderungen innerhalb der Nieren. Dabei kommt es zu einer zystischen Degeneration der Tubuli (Harnkanälchen) (vgl. Abb. 1), wobei beide Nieren in gleichem Maße betroffen sind.



**Abb. 1: Zystenbildung bei polyzystischen Nierenerkrankungen (Wilson, 2004; modifiziert);**  
**a)** Funktionseinheit der Niere = Nephron; Nierenfilter = Glomerulum; Harnkanälchen = Tubuli;  
**b)** Zystenbildung bei der autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung (s. 1.1);  
**c)** Zystenbildung bei der autosomal-rezessiv vererbten polyzystischen Nierenerkrankung

Im Wesentlichen kann jeder Abschnitt des Nephrons, vom Glomerulum bis hin zum Sammelrohr, von der Zystenbildung betroffen sein (Gardner et al., 1994; Gallagher et al., 2002). Durch eine exzessive Proliferation der Nierenepithelzellen wird die Anzahl der Zellen innerhalb der Zystenwand erhöht. Im Zystenlumen sammelt sich durch eine transepitheliale Flüssigkeitssekretion und/oder einen verminderten Abfluss Flüssigkeit an (Grantham, 1993; Grantham et al., 1995; Charron et al., 2000; Wilson et al., 2000). Spätestens bei einer Ausbildung von mehreren hundert Zysten wird die Filterfunktion der Nieren eingeschränkt und dies kann zum vollständigen Verlust der Nierenfunktion führen. Oft sind auch weitere Organe, wie Leber, Pankreas und mitunter auch das Gehirn von der Zystenbildung betroffen. Symptome und Beschwerden bei Betroffenen können unter anderem Bluthochdruck, Schmerzen im Bereich der Nieren, Blut im Urin, sowie Entzündungen der Blase und des Nierenbeckens sein (Ong and Harris, 2005).

Bei polyzystischen Nierenerkrankungen (engl.: *polycystic kidney disease*, PKD) unterscheidet man zwischen „erworbenen“ und „hereditären“ Zystennieren (Fick and Gabow, 1994). Genetisch bedingte Zystennieren durch Vererbung übertragener Defekte in bestimmten Genen stellen eine der häufigsten Erbkrankheiten beim Menschen dar.

### 1.1 Autosomal-dominante Form der polyzystischen Nierenerkrankung

Den größten Anteil an den Zystennieren-Erkrankungen trägt die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (engl.: *autosomal-dominant polycystic kidney disease*, ADPKD) (Gallagher et al., 2002; Wilson, 2004); sie stellt die häufigste erbliche Ursache eines chronischen Nierenversagens dar. Charakteristisch für diese Form der polyzystischen Nierenerkrankung ist die progressive Entwicklung flüssigkeitsgefüllter Zysten in allen Bereichen der Nephrone und Sammelrohre (vgl. Abb. 1b). Die Nephrone als kleinste funktionelle Einheiten der Niere, welche der Harnbildung und -konzentration dienen, werden durch die Vergrößerung der Zysten, die bereits pränatal als Mikrozysten vorhanden sind, in ihrer Funktionalität beeinträchtigt. Dies führt zu einer Vergrößerung der Nieren und schließlich wird auch das restliche normale Nierengewebe von den flüssigkeitsgefüllten Aussackungen verdrängt (Harris, 1999; Gardner et al., 1994). Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird dadurch stark beeinträchtigt und es kann zu einem jährlichen GFR-Verlust von 5 ml/min kommen (Grantham et al., 2006). Dies hat oftmals eine vollständige Niereninsuffizienz zur Folge, wobei stets beide Nieren gleichermaßen betroffen sind. Die Inzidenz der auch als Nierendegeneration Potter Typ III bezeichneten Krankheit (Buchholz, 2004) liegt bei 1:500 bis 1:1.000 Lebendgeburten (Wilson, 2004) und stellt daher mit weltweit ~10 Millionen Patienten eine der häufigsten lebensbedrohenden Erbkrankheiten dar, welche nicht geschlechtsspezifisch weitergegeben wird.

Inzwischen ist der molekulargenetische Krankheitsmechanismus der ADPKD weitgehend entschlüsselt. Bisher wurden Mutationen in zwei verschiedenen Genen als Ursache der Erkrankung sicher nachgewiesen. Dabei handelt es sich um die Gene *PKD1* und *PKD2*. Diese beiden Gene liegen nicht auf den Geschlechtschromosomen, sondern wurden im autosomalen Bereich des Chromosomensatzes identifiziert. 85% der betroffenen Patienten weisen signifikante Mutationen des Gens *PKD1* auf (Rossetti et al., 2001), welches auf Chromosom 16 (Genlocus 16p13.3-p13.12) liegt und für das Protein Polycystin-1 kodiert. Bei den restlichen 15% der Patienten wird die Krankheit durch einen oder mehrere Defekte im Gen *PKD2* ausgelöst (Rossetti et al., 2001), welches auf dem Chromosom 4 (Genlocus 4q21-q23) liegt und für das Protein Polycystin-2 kodiert (Peters and Sandkuijl, 1992; Kimberling et al., 1993). Das durch die Mutationen in *PKD1* und/oder *PKD2* verursachte Krankheitsbild weist den gleichen Phänotyp auf, wobei ein Defekt im *PKD2*-Gen sowohl einen späteren Beginn der Symptome als auch einen milderen und langsameren Verlauf des Krankheitsbildes aufweist als eine Mutation im *PKD1*-Gen.

Als weitere molekulare Ursache für die ADPKD wurde bereits noch ein drittes Gen, *PKD3*, vermutet (Paterson and Pei, 1999; Paterson and Pei, 1998; Bogdanova et al., 1995; Daoust et al., 1995), dessen Existenz jedoch bis dato nicht nachgewiesen wurde und weiterhin bezweifelt wird (Consugar et al., 2005).



Bei der ADPKD kann es zum Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) (Qian et al., 1996) kommen, was bedeutet, dass sowohl eine Keimbahnmutation als auch eine weitere somatische Mutation in den genannten Genen stattfindet (Wu et al., 1998; Qian and Germino, 1997). Dabei verliert die betroffene Zelle die Fähigkeit, die Proliferation zu hemmen, d. h. die Tumorsuppressorfunktion der Proteine wird inaktiviert und somit die Zystenbildung initiiert (Pei et al., 1999). Diese *Second-hit*-Theorie erklärt auch die Tatsache, weshalb nur ein geringer Prozentsatz der Nephrone Zysten ausbilden, wobei alle Zellen die vererbte Mutation enthalten.

## 1.2 Polycystin-2

### 1.2.1 Lokalisation und Funktion von Polycystin-1 und Polycystin-2

Die Genprodukte von *PKD1* und *PKD2*, Polycystin-1 und -2 (s. Abb. 2), sind integrale Membran-Glykoproteine der primären Zilien der Nierenepithelzellen und sind dort an der Morphogenese der renalen Tubuli beteiligt.

Das von *PKD1* kodierte Protein Polycystin-1 (PC1) mit einer molekularen Masse von 462 kDa stellt ein großes Membranprotein mit 11 Transmembrandomänen, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus dar (Nimes et al., 2003; The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Hughes et al., 1995). Dagegen handelt es sich bei dem von *PKD2* kodierten 110 kDa Protein Polycystin-2 (PC2) um ein vergleichsweise kleines Membranprotein mit 6 Transmembrandomänen, dessen N- und C-Termini jeweils ins Zellinnere reichen (Mochizuki et al., 1996).

Die relativ große extrazelluläre N-terminale Domäne von PC1 ist mit diversen strukturellen Bereichen wesentlich an Protein-Protein- und Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen beteiligt (Herbst, 2009; s. a. Hoffmeister, 2008). Dahingegen spielt der intrazellulär gelegene N-Terminus von PC2 unter anderem eine wesentliche Rolle bei der Lokalisation des Proteins. Die ersten 15 N-terminalen Aminosäuren enthalten ein sog. RVxP-Motiv, welches für den Proteintransport in das Zilium benötigt wird (Geng et al., 2006).

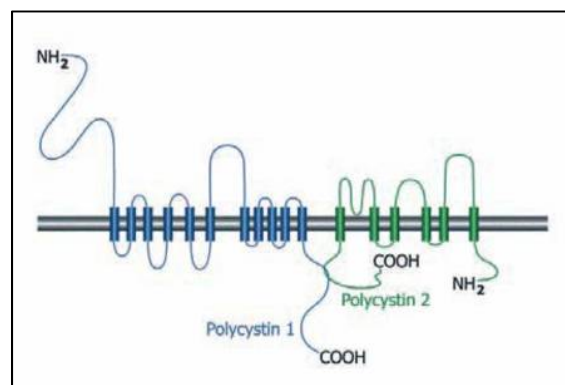


Abb. 2: Modell des Polycystin-1/Polycystin-2 – Komplexes

Beide Proteine interagieren über ihre intrazellulär lokalisierten C-Termini miteinander. Der Polycystin-1/Polycystin-2 – Komplex ist über verschiedene Signaltransduktions-Kaskaden an Proliferation, Apoptose, Differenzierung sowie der Regulation von Zellform und Durchmesser der Nierentubuli beteiligt (Ong et al., 2005; Igarashi and Somlo, 2002; Grantham 2001).

### 1.2.2 Polycystin-2 fungiert als nicht-selektiver Kationen-Kanal

Da der Fokus dieser Arbeit unter anderem auf dem intrazellulären Transport von Polycystin-2 liegt, wird im Folgenden hauptsächlich auf diesen Sachverhalt eingegangen.

Polycystin-2 wird in der Familie der TRP (*transient receptor potential*)-Kanäle in die Polycystin-Unterfamilie (TRPP) eingeordnet und daher auch unter dem Namen TRPP2 (*transient receptor potential protein 2*) geführt (Clapham et al., 2005). Der C-Terminus von PC2 enthält außer der mit PC1 interagierenden Domäne weitere funktionelle strukturelle Motive. Dazu zählt ein Calciumsensitives Helix-Loop-Helix-Motiv, welches als EF-Hand (Asn<sup>720</sup> – Pro<sup>797</sup>) bezeichnet wird und über einen Linker mit einer ‚coiled-coil‘-Domäne verbunden ist (Petri et al., 2010; Gifford et al., 2007; Mochizuki et al., 1996). Am Ende des C-Terminus liegt ein 34 Aminosäuren langes ER-Retentions-signal (Glu<sup>787</sup> – Gly<sup>821</sup>) (Cai et al., 1999). In den Transmembran-Domänen bestehen sowohl Homologien zu PC1 als auch zu anderen spannungsgesteuerten Kanälen der TRP-Familie (Somlo and Ehrlich, 2001; Mochizuki et al., 1996). Ein weiterer, eine Porenregion bildender Bereich zwischen Membrandomäne 5 und 6 wurde als wenig selektiv gegenüber Kationen wie beispielsweise Ca<sup>2+</sup> getestet (Clapham et al., 2001). Ein Beweis für die Wichtigkeit der Kanalfunktion von PC2 ist, dass ein Austausch einer einzigen Aminosäure in dem Bereich zwischen diesen beiden Transmembran-Domänen bereits zur Initialisierung von ADPKD führen kann (Koulen et al., 2002).

### 1.2.3 Intrazelluläre Lokalisation von Wildtyp-Polycystin-2 und seiner Mutanten

Die intra- bzw. – genauer – subzelluläre Lokalisation wird aufgrund bisher publizierter Daten kontrovers diskutiert. Einige Befunde deuten auf eine Lokalisation vorwiegend am endoplasmatischen Retikulum (ER) hin (Cai et al., 1999), zum Teil auch im primären Zilium bzw. an dessen Membran (Hoffmeister et al., 2011; Nauli et al., 2003), wohingegen andere Befunde zeigen, dass PC2 auch in die Zytoplasmamembran eingebaut wird (Hoffmeister et al., 2011; Koulen et al., 2002; Schefers et al., 2002). Im Laufe dieser Arbeit wurden für intrazelluläre Lokalisationsstudien sowohl das Volllängen-PC2-Protein (s. 1.1.2), als auch diverse kürzere PC2-Proteinvarianten verwendet. Eine der wichtigsten ist die PC2 (1/703)-Deletionsmutante. Dabei wurden die Aminosäuren am C-Terminus nach Aminosäure Leu<sup>703</sup> entfernt. Diese C-terminale Sequenz enthält unter anderem ein funktionelles Element, welches als ER-Retentionssignal fungiert (s. 1.1.2.2).

Davon abgeleitet wurden zwei weitere sog. Alanin-Mutanten von Polycystin-2 verwendet, bei welchen jeweils drei Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden: PC2 (1/703) (KLF→AAA) (AS 572-574) und PC2 (1/703) (KFI→AAA) (AS 575-577). Die KLKFI-Sequenz von Lys<sup>572</sup> – Ile<sup>577</sup> (Lys-Leu-Phe-Lys-Phe-Ile) wurde aufgrund experimenteller Daten als Exportmotiv identifiziert (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008).

Grundsätzlich ist zu unterscheiden zwischen exogenem und endogenem Protein und auch an welchen Organismen bzw. Zelllinien diese getestet werden. Es existieren viele widersprüchliche Veröffentlichungen. Da das Zentrum des Forschungsinteresses dieser Arbeit die polyzystische Nierenerkrankung bildet, beschränkt sich dieser Teil auf Ergebnisse der Nierenforschung. Als Modelle dienen diverse Nierenzelllinien, wie die Nierenepithel-Zellen LLC-PK<sub>1</sub> (primäre Tubulus-Zellen aus der Schweineniere), HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), MDCK (*Madine Darby Canine Kidney*), COS-7 (Fibroblasten-Zellen aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze [*Cercopithecus aethiops*]) oder mIMCD (*mouse Inner Medullary Collecting Duct*) Zellen.

Für LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen, als auch für HEK293- und COS-7-Zellen wurde beschrieben, dass heterogenes bzw. endogenes PC2 im endoplasmatischen Retikulum zu finden ist (Liang et al., 2008; Hidaka et al., 2004; Koulen et al., 2002; Cedzich, 2000; Gallagher et al., 2000; Cai et al., 1999). In anderen Veröffentlichungen werden die Ergebnisse an LLC-PK<sub>1</sub>-, MDCK-, HEK293-, COS-7 und mIMCD3-Zellen so interpretiert, dass eine Translokation von endogenem und exogenem PC2 zur Plasmamembran stattfindet (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister et al., 2010; Abraham et al., 2010; Luo et al., 2003; Scheffers et al., 2002; González-Perrett et al., 2001).

Diese kontroverse Diskussion herrscht nicht nur im Bezug auf die angewandten Zellsysteme; auch bei *in-vivo*-Experimenten mit Nierengewebe werden unterschiedliche Lokalisationen von Polycystin-2 diskutiert. Endoglykosidase H- und Gradientenzentrifugations-Versuche mit adulten Nieren zeigten, dass PC2 hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum vorkommt (Koulen et al., 2002; Cai et al., 1999), wobei weitere immunhistochemische Untersuchungen die Lokalisation von PC2 in basalen Zellkompartimenten von distalen Tubulus-Zellen (Obermüller et al., 2002; Obermüller et al., 1999) und bei fetalen Nieren in der Plasmamembran (Ong et al., 1999) zeigten.

Polycystin-2 ist zusätzlich in einem weiteren Zellorganell, dem sog. primären Zilium (s. I.2) lokalisiert bzw. in dessen Plasmamembran; dieses wurde sowohl in Zellkultur (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister et al., 2010; Sohara et al., 2008; Geng et al., 2006; Streets et al., 2006; Köttgen et al., 2005; Pazour et al., 2003; Pazour et al., 2002; Cai et al., 1999), als auch am Nierengewebe (Gallagher et al., 2006; Yoder et al., 2002) gezeigt.

Bereits frühere (institutseigene) Ergebnisse zeigten, dass sowohl das Volllängen-PC2-Protein als auch oben genannte PC2-Deletionsmutanten ins primäre Zilium von LLC-PK<sub>1</sub>- und HEK293-Zellen transportiert werden (vgl. Hidaka et al., 2004). Bei den diversen PC2 (1/703)-Deletionsmutanten

wurde, wie bereits erwähnt, der C-Terminus entfernt. Die Beobachtung, dass diese Konstrukte nach wie vor ins primäre Zilium wandern, gab Grund zur Annahme, dass die C-terminale Sequenz keine Rolle bei der Zilienlokalisation spielt. Mit Ausnahme der Zilienlokalisation wurden allerdings beim Wildtyp-PC2-Protein, der PC2 (1/703)-Deletions- und den PC2 (1/703)-AAA-Mutagenese-Mutanten unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen beobachtet (vgl. Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008; s. Ergebnisse). Immunhistochemische und später in dieser Arbeit dargestellte elektronenmikroskopische Ergebnisse zeigten, dass das PC2 (1/703)-Protein zur Plasmamembran der Zelle transloziert wird, wohingegen die PC2 (1/703)-AAA-Mutagenese-Proteinmutanten (s. oben) nicht in der Zytoplasmamembran beobachtet werden konnten. Die Gegenüberstellung der PC2 (1/703)-Deletions- und PC2 (1/703)-AAA-Mutagenese-Proteinmutanten zeigte, dass das gefundene KLFKFI-Exportmotiv für die Translokation zur Zytoplasmamembran verantwortlich ist (Hoffmeister, 2008). Eine Lokalisation des PC2-Volllängen-Proteins an der Zytoplasmamembran wurde bis dato nicht beschrieben. Die Befunde der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisationen der genannten Proteinkonstrukte, aber auch deren gemeinsame Lokalisation im primären Zilium weisen auf unterschiedliche ziliäre Transportwege der Membranproteine hin.

## 2 Primäres Zilium

Diese Arbeit konzentrierte sich hauptsächlich auf das Zellorganell, das sog. primäre Zilium, welches erstmals von Sergei Sorokin (Satir et al., 2010; Sorokin, 1968) so benannt wurde.

Primäre Zilien galten lange als funktionsfreies, evolutionäres Überbleibsel, doch in den letzten Jahren rückten sie aufgrund neuer Erkenntnisse im Hinblick auf diverse Krankheiten in den Fokus intensiver Forschungen. Untersuchungen an niederen Organismen, wie *Chlamydomonas* und *Caenorhabditis elegans* als auch an Zellkulturen und Mausmodellen trugen zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen primären Zilien und humanen Erkrankungen bei (Gerdes et al., 2009; Davenport and Yoder, 2005; Wheatley, 1995; Perkins et al., 1986; Afzelius, 1976). Primäre Zilien sind auch an der Entwicklung von Wirbeltieren beteiligt (Goetz and Anderson, 2010; Jones et al., 2008; Cano et al., 2004; Pazour et al., 2004; Huangfu et al., 2003; Pazour and Witman, 2003; Murcia et al., 2000; Nonaka et al., 1998).

Im Allgemeinen handelt es sich bei Zilien um antennenartige Fortsätze an der Oberfläche von Zellen, wobei zwischen zwei Haupttypen von Zilien unterschieden werden muss: den motilen und den immotilen Zilien; zu Letzteren wird das primäre Zilium gezählt. Primäre Zilien sind auf fast allen Zellen im menschlichen Körper zu finden (Wheatley, 1982; <http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilia3.htm>), wobei im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf primären Zilien von renalen Tubulus-Epithelzellen (LLC-PK<sub>1</sub>, HEK293, mIMCD, MDCK) lag. In der Säugerniere kommen ausschließlich nicht bewegliche primäre Zilien vor, und zwar in der Bowmankapsel, dem proximalen und distalen

Tubulus, sowie auf den Hauptzellen des Sammelrohrs (allerdings nicht auf den interkalierenden Zellen) (Webber and Lee, 1975).

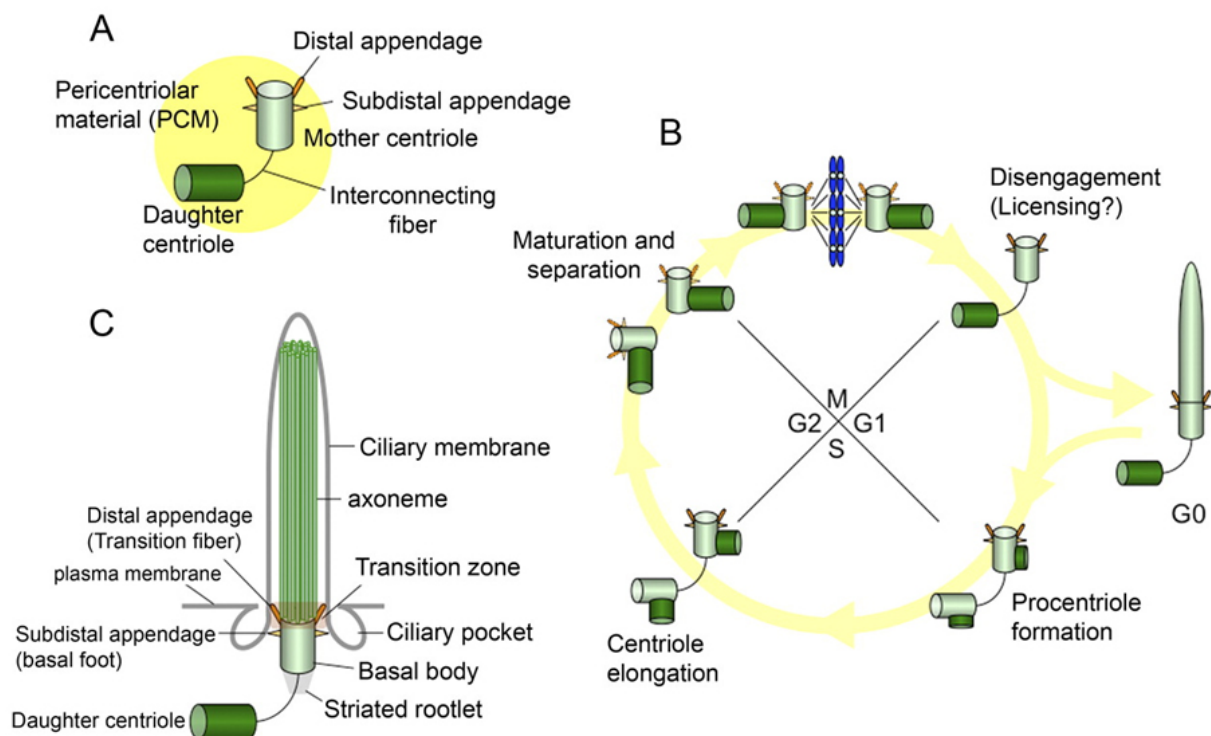
## 2.1 Funktion und Aufbau des primären Ziliums

Primäre Zilien ragen auf der apikalen Seite der Zelle in den Extrazellularraum. Im Falle der Nieren reichen sie in die Lumina der renalen Tubuli und des Sammelrohrs. Eine Arbeitshypothese sagt, dass sie dort beispielsweise den Fluss des sich aufkonzentrierenden Harns messen und so als Mechanosensor fungieren. Es wird auch angenommen, dass das Zilium unabhängig von mechanischen Reizen als eine Art ‚Antenne‘ für Signalmoleküle dient und so Informationen chemosensorisch ins Zellinnere leitet (Fliegau et al., 2007; Benzing and Walz, 2006). Desweiteren wurde bereits gezeigt, dass primäre Zilien ebenso auf Licht (Insinna and Besharse, 2008), Temperatur (Kuhara et al., 2008), Osmolalität (Christensen et al., 2005) oder Schwerkraft (Moorman and Shorr, 2008) reagieren können. Der Ausfall dieser Antennen ist der wohl wichtigste Schritt auf dem Weg zur Zystenentstehung bei der ADPKD (s. 1.1) als auch bei einigen weiteren Erkrankungen, bei denen polyzystische Nieren, Polydactylie und Verlust des Seh- und Hörvermögens als Symptome gelten (Tobin and Beales, 2007; Yoder 2007; Badano et al., 2006). Einen der ersten experimentellen Beweise der Funktion von primären Zilien lieferten Studien des *Tg737<sup>orpk</sup>*-Mausmodells, wobei eine Mutation im *Tg737*-Gen zu einer polyzystischen Nierenerkrankung führte (Moyer et al., 1994). Weitere Studien an *Chlamydomonas* belegten, dass das Tg737-Protein, ein Homolog zum IFT88-Protein, wesentlich am Aufbau von primären Zilien beteiligt ist (Pazour et al., 2000). Primäre Zilien sind auch bei der Entwicklung (Haycraft et al., 2007; Koyama et al., 2007; Mc Glashan et al., 2007; Xiao et al., 2006; Zhang et al., 2003) und Homöostase (Malone et al., 2007) des Skeletts involviert (Anderson et al., 2008). Die Bildung primärer Zilien ist zellzyklus- und differenzierungsabhängig (Pan and Snell, 2007; Bettencourt-Dias and Carvalho-Santos, 2008; Kobayashi and Dynlacht, 2011; Erklärung s. Abb. 3B).

In der Regel besitzt jede Zelle nur ein einziges primäres Zilium (Pan et al., 2005; Wheatley, 1995). Der Durchmesser eines primären Ziliums liegt bei etwa 0,25 µm (Andrews and Porter, 1974), wobei die Länge des Ziliums abhängig vom Zelltyp sehr variabel sein kann; *in-vivo* haben sie ähnlich wie die Mikrovilli eine Länge von 1 – 2 µm (van der Heiden et al., 2008), wohingegen sie in Zellkultur je nach Zelllinie auch 5 bis 10 µm und im Extremfall bis zu 100 µm lang werden können (Anderson et al., 2008). Das Zilium ist komplett von einer Membran umgeben, welche eine Fortsetzung der Zytoplasmamembran (somatische Plasmamembran) darstellt (Vieira et al., 2006; Benzing and Walz, 2006; Praetorius and Spring, 2005; Kellogg et al., 1989), wobei sich die Lipid- und Protein-Zusammensetzungen der somatischen und der Zilienmembran unterscheiden (Eggenchwiler and Anderson, 2007; Tyler et al., 2009). Im Gegensatz zur somatischen Membran besitzt die ziliäre Plasmamembran einen höheren Anteil an Sterolen, Glyco- und Sphingolipiden (Tyler et

al., 2009). Auch die Proteinzusammensetzungen unterscheiden sich, was sich bereits bei den Proteinmodifikationsschritten im Golgi andeutet (Ejsing et al., 2009; Schuck and Simons, 2004).

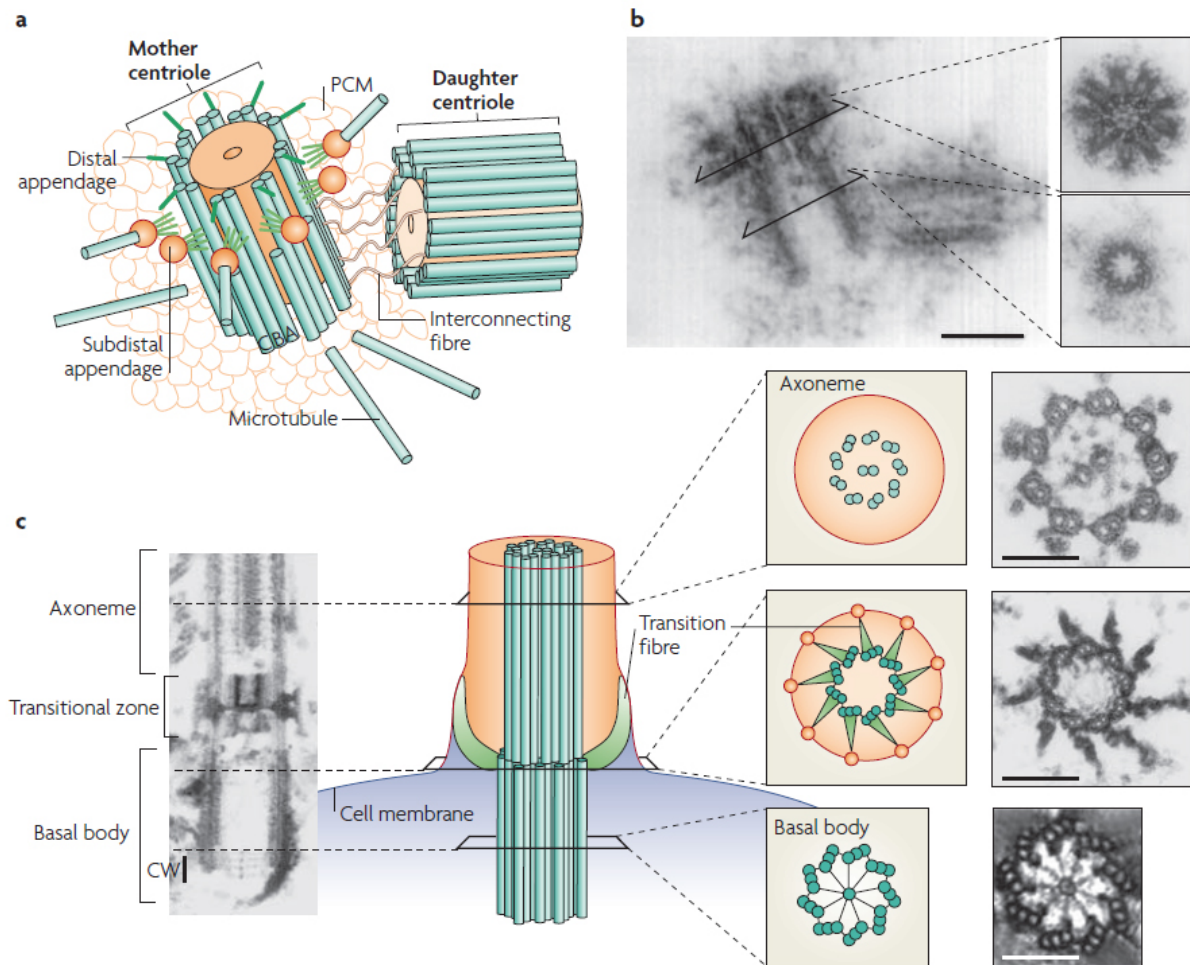
Im Inneren des Ziliums befindet sich das Gerüst, das sog. Axonem. Dieses ist aufgebaut aus neun peripheren Mikrotubuli-Paaren (A und B; s. Abb. 3), wobei beim primären Zilium im Vergleich zu den beweglichen Zilien zwei strukturelle Komponenten fehlen: das zentrale Paar an Mikrotubuli  $[(9 \times 2) + 0]$  – Struktur (Jensen et al., 2004; Perkins et al., 1986; vgl. Abb. 3C), sowie die Dyneinarme, die für die Motilität notwendig sind (Satir and Christensen, 2007). Die Assemblierung des Mikrotubuli-Achsenskeletts findet an der Spitze des Ziliums statt (Pedersen et al., 2008; van de Weyer, 2008) und der Transport der Proteine vom Zytoplasma an die Spitze des Ziliums erfolgt mit Hilfe des sog. intraflagellaren Transports (IFT; s. 3.1) (Baldari and Rosenbaum, 2010; Follit et al., 2006; Jurczyk et al., 2004; Scholey, 2003; Pazour et al., 2002; Rosenbaum and Witman, 2002; Cole et al., 1998; Kozminski et al., 1993). Dabei handelt es sich um ein gegenläufiges Transportsystem, erstmals in der grünen Alge *Chlamydomonas* beschrieben (Rosenbaum and Witman, 2002; Singla and Reiter, 2006). Die Mikrotubuli des Axonems dienen dabei als Leitschiene für den Proteintransport, da im Zilium keine eigene Proteinsynthese stattfindet (Scholey, 2008; Rosenbaum and Witman, 2002). Die Generierung der Mikrotubuli findet in der Interphase des Zellzyklus ausgehend von einem plasmamembran-assoziierten Basalkörperchen (*basal body*, s. I.2.2) statt, welcher sie zusätzlich im Zytoplasma der Zelle verankert (Gerdes et al., 2009; Michaud and Yoder, 2006; Friedmann and Bird, 1971).



**Abb. 3: Zentrosomen, Zilien und der Zellzyklus.** (Abb. aus Kobayashi and Dynlacht, 2011; modifiziert: Carvalho-Santos et al., 2010; Bettencourt-Dias and Carvalho-Santos, 2008; Deane et al., 2001; Sorokin, 1962) **(A)** Bei Beginn eines neuen Zellzykluses besitzt jede Zelle ein Zentrosom, welches aus einem Mutter- und einem Tochterzentriol besteht. Beide sind von einer Proteinmatrix, dem sog. perizentriolären Material umgeben. Das Mutterzentriol besitzt ‚distale‘, ‚subdistale‘, sowie ‚proximale Anhängsel‘. Beide Zentriolen werden durch ‚Verbindungsfasern‘ verbunden. **(B)** In der S-Phase des Zellzyklus verdoppelt sich das Zentrosom; diese Prozentriolen bilden sich in der G2-Phase zu sog. Mikrotubuliorganisierenden Zentren (MTOC; *Microtubule organizing center*) weiter aus. Zum Zeitpunkt der Spindelbildung in der späten G2- bzw. frühen M-Phase sind die Zentrosomen gereift, haben sich geteilt, und sind zu den Kernpolen gewandert, wo die Spindelbildung aus dem perizentriolären Material induziert wird. Ausgereifte, nicht mehr teilungsfähige Zellen verbleiben nach der mitotischen Zellteilung in der G1-Phase, die dann als G0-Phase bezeichnet wird. Dabei wandert das Mutterzentriol in Richtung Zytoplasmamembran und heftet sich an ein Membranvesikel an, von welchem es eingeschlossen wird. Das Mutterzentriol wird zum Basalkörperchen und die Bildung eines primären Ziliums wird induziert. Der Mikrotubuluskern des Ziliums (Axonem) beginnt direkt aus den Mikrotubuli der Zentriole zu wachsen. Sobald das Vesikel mit der Zellmembran verschmilzt, sprosst das Zilium aus dieser aus und wird über den Intraflagellaren Transport aufgebaut. Ist die Zelle noch nicht ausdifferenziert und geht nicht in die G0-Phase über, verkürzt sich das Zilium in der späten G2- bzw. frühen M-Phase wieder (Rieder et al., 1979; Tucker et al., 1979). **(C)** Bereits bei der Bildung des Basalkörperchens werden mehrere Anhänge beobachtet: ‚Übergangsfasern‘ (distale *transition fibers*), ‚basale Füßchen und Kappenstrukturen‘ (subdistale *basal foot and cap structures*) und ‚gestreifte Wurzelfasern‘ (proximale *striated rootlets*). Die ‚Übergangsfasern‘ verbinden das Basalkörperchen mit der somatischen Plasmamembran in der ‚Übergangszone‘ zum primären Zilium (*transition zone*). Dort verändert sich die 9x3-Mikrotubuli-Struktur des Zentriols zum 9x2-aufgebauten Mikrotubuli-Axonem des Ziliums. Das Axonem ist von einer ziliären Plasmamembran umgeben. Oftmals werden in der Nähe des Basalkörperchens sog. ‚ziliäre Aussackungen‘ (*ciliary pockets*) beobachtet (Kobayashi and Dynlacht, 2011).

## 2.2 Basalkörperchen

Im Basalkörperchen sind die Mikrotubuli im Gegensatz zum Zilium in neun peripheren Triplets angeordnet (Dutcher, 2003; Gibbons and Grimstone, 1960; s. Abb. 4). Das Basalkörperchen entstammt als Mutterzentriol neben dem Tochterzentriol dem Zentrosom (s. Abb. 3 A und B), welches für die Organisation des Cytoskeletts zuständig ist und sich auch an den Polen der mitotischen Spindeln befindet (Bettencourt-Dias and Glover, 2007). Bei einer Fehlorientierung der mitotischen Spindeln und/oder fehlerhafter Zellproliferation kann es zur Zystenbildung bei der ADPKD (s. 1.1) kommen (Fischer et al., 2006; Goetz and Anderson, 2010). Beide Zentriolen sind von einem perizentriolären Material (s. Abb. 3A) umgeben, woran zytoplasmatische Mikrotubuli andocken (Anderson et al., 2008). Die Bildung eines primären Ziliums beginnt, wenn das distale Ende des Mutterzentriols mit einem etwa 300 nm großen Vesikel [unbekannten Ursprungs bzw. vom Golgi kommend] fusioniert (Alieva and Vorobjev, 2004; Sorokin, 1962), sich zum Basalkörperchen ausdifferenziert und so zur Zytoplasmamembran wandert. Nach Fusionierung mit dieser bildet sich eine ‚Übergangszone‘ aus, in der sich aus dem 9x3-aufgebauten Basalkörperchen das 9x2-zusammengesetzte Axonem des primären Ziliums (Anderson et al., 2008; s. Abb. 4) entwickelt.



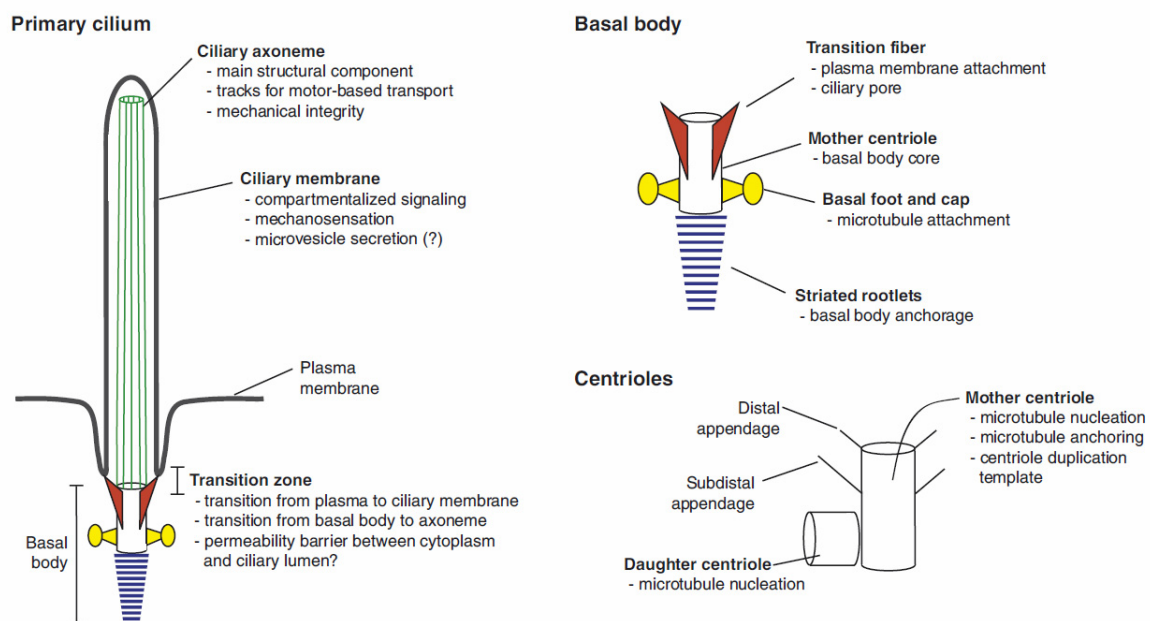
**Abb. 4: Struktur der Zentriolen und des Basalkörperchens (modifiziert: Bettencourt and Glover, 2007; Sluder, 2005; Geimer and Melkonian, 2004; Rosenbaum and Witman, 2002; Paintrand et al, 1992)** **a)** Schematische Ansicht eines Centrosoms. In jedem Mikrotubuli-Triplett wird das Innerste als A-Tubuli, das Mittlere als B-Tubuli und das Äußerste als C-Tubuli bezeichnet. Am distalen Ende des Mutterzentriols findet der Übergang von der Triplett- in die Doublett-Struktur statt. **b)** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Centrosoms. Die obere kleine Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch den Teil des Basalkörperchens mit subdistalen Anhängseln. Die untere kleine Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch den proximalen Teil des Basalkörperchens [Maßstab 0,2  $\mu\text{m}$ ] **c)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Darstellungen eines Flagellums von *Chlamydomonas* (grüne Alge). Es gibt 3 verschiedene Typen von Zilien und Flagellen, abhängig von der Struktur des Axonems. Das Axonem ist eine zylindrische Anordnung von neun peripheren Mikrotubuli-Paaren, die entweder keine  $[(9 \times 2) + 0]$  oder zwei einzelne Mikrotubuli  $[(9 \times 2) + 2]$  im Zentrum einschließen (hier gezeigt). Die beiden einzelnen Mikrotubuli werden als zentrales Paar bezeichnet. Der unterschiedliche Aufbau ist abhängig davon, ob der Zellanhang beweglich oder nicht beweglich ist (Satir and Christensen, 2007). Die „Übergangsfasern“ ragen vom distalen Ende des Basalkörperchens zur Zytoplasmamembran. Eine Hypothese ist, dass sie einen Teil eines Poren-Komplexes darstellen, welcher den Eintritt von Molekülen in das Zilium kontrolliert. [Maßstab: 0,25  $\mu\text{m}$ ] [CW: cartwheel]

### 2.3 Hypothetische Funktionen der strukturellen Hauptbestandteile

Die Forschung an primären Zilien ging vielen anderen zellbiologischen Forschungsgebieten voraus und ist mittlerweile über 110 Jahre alt (Wheatley, 2005; Zimmermann, 1898). Mit dem Fortschritt der Elektronenmikroskopie konnten bereits in den 1950er Jahren primäre Zilien in höherer Auflösung dargestellt werden (Wheatley, 1982; Currie and Wheatley, 1966; Sorokin, 1962; de



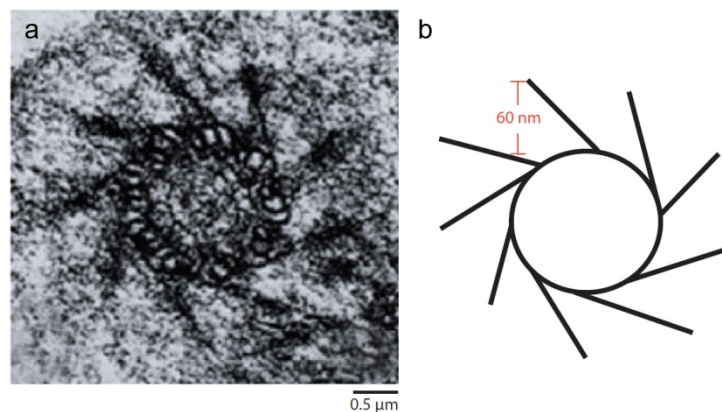
Harven and Bernhard, 1956). Der Fokus lag lange Zeit auf dem Zentriol und seiner Funktion bei der Zellteilung, ungeachtet der unmittelbaren Ausbildung eines primären Ziliums. Auch nach dem Befund eines Zusammenhangs zwischen Zentriol und primärem Zilium wurden zwar zahlreiche Aufnahmen von sich ausbildenden Basalkörperchen und elongierenden Zilien gemacht (Sorokin, 1962), trotzdem konnten für sämtliche strukturellen Befunde bis dato noch keine genauen Funktionen definiert werden. Unklar ist zum einen, wie Membranproteine vom Zytoplasma ins primäre Zilium transportiert werden (s. 3.2), und zum anderen, ob sich zwischen dem Zellkörper und dem Zellanhang eine Diffusionsbarriere befindet. Eine Zusammenfassung aller Hypothesen bezüglich der gefundenen Strukturen am Basalkörperchen findet sich bei Seeley and Nachury (2010) (s. Abb. 5). Bislang wurden drei Hauptstruktur-Typen von Anhängen am Basalkörperchen beschrieben. Wie bereits in Abb. 3 gezeigt, werden diese allgemein als distale, subdistale und proximale Strukturen bezeichnet. Der distale Teil des Basalkörperchens befindet sich in der Nähe der Zytoplasmamembran, wohingegen das proximale Ende ins Zellinnere gerichtet ist.



**Abb. 5: Strukturelle Merkmale und Funktionen von primären Zilien, Basalkörperchen und Zentriolen (Seeley and Nachury, 2010).** Die strukturellen Hauptbestandteile eines primären Ziliums sind das Basalkörperchen, das Axonem und die ziliäre Plasmamembran. Basalkörperchen sind modifizierte Mutterzentriolen (s. Abb. 3), welche zusätzliche Strukturen, wie ‚Übergangsfasern‘ (*transition fibers*), ‚basale Füßchen- und Kappenstrukturen‘ (*basal feet and caps*) und ‚gestreifte Wurzelfasern‘ (*striated rootlets*) ausgebildet haben. Die Mikrotubuli-Tripletts des Basalkörperchens bilden sich in der ‚Übergangszone‘ (*transition zone*) zu Mikrotubuli-Paaren des ziliären Axonems um. Zentriolen werden meist nahezu rechtwinklig gepaart beobachtet und bestehen aus einem Mutter- und einem Tochterzentriol, wobei das Mutterzentriol die spezialisierten Funktionen übernimmt.

### 2.3.1 ‚Übergangsfasern‘ (Transition fibers bzw. Alar sheets)

Vom distalen Ende des Basalkörperchens aus verläuft die Grenze, die das primäre Zilium vom Zytoplasma trennt. Die Abgrenzung bilden die sog. ‚Übergangsfasern‘ (Anderson et al., 2008; Sorokin, 1962; Gibbons and Grimstone, 1960). Es handelt sich dabei um die in der Literatur am meisten diskutierten Anhänge des Basalkörperchens. Ausgehend von den äußeren Mikrotubuli des Basalkörperchens (s. I.2.2) reichen diese bis zur (periziliären) Zytoplasmamembran, welche am Ansatzpunkt der Fasern in die ziliäre Membran übergeht (s. Abb. 7). Am Ursprung der Fasern am Basalkörperchen ändert sich auch die Mikrotubuli-Organisation; hier geht die Triplett-Struktur in die Doublett-Anordnung des Axonems über (s. Fig. 2 in Dutcher, 2003). Je nach Betrachtungswinkel erscheinen die Fasern als Y-förmige Strukturen (Bisgrove and Yost, 2006; Martin et al., 1988) bzw. als Flügel-ähnliche Blätter (*Alar sheets*; Hagiwara et al., 1997; Anderson, 1972), die eine trapez-artige Struktur, vergleichbar mit einem Sektglaskelch (Yamamoto and Kataoka, 1986), ausbilden. Im Querschnitt erscheinen sie wiederum als ‚Radspeichen-ähnliche‘ Gefüge (s. Abb. 6; Seeley and Nachury, 2010; Dute and Kung, 1978).



**Abb. 6:** ‚Übergangsfasern‘ (modifiziert Nachury et al., 2010; Fig.3) **a)** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Quer- bzw. Transversalschnitts durch das distale Basalkörperchen. **b)** Der Abstand zwischen den einzelnen ‚Übergangsfasern‘ beträgt ~60 nm.

Der Abstand zwischen den einzelnen ‚Speichen‘ beträgt etwa 60 nm (s. Abb. 6b; Nachury et al., 2010). Daher wird den ‚Übergangsfasern‘ eine eventuelle Filterfunktion für das primäre Zilium zugeschrieben (Satir et al., 2010; Bisgrove and Yost, 2006; Singla and Reiter, 2006), da bei einem möglichen Proteintransport nur Partikel <60 nm passieren können. Es wurde bereits früh darauf hingewiesen, dass sich an den membran-assoziierten Enden der ‚Übergangsfasern‘ vorwiegend Partikel ansammeln (Weiss et al., 1977; Ringo, 1967). Immunogold-Markierungen an Dünnschnitten zeigten, dass die für den Aufbau des primären Ziliums wichtigen IFT-Partikel (s. 3.1) an die ‚Übergangsfasern‘ andocken (Deane et al., 2001). Daher könnten diese nicht nur als Filter fungieren, sondern darüber hinaus auch als Beladungsstation für die (membrangebundenen) ziliären Proteine (Rosenbaum and Witman, 2002).

### 2.3.2 ‚Basale Füßchen- und Kappenstrukturen‘ (*Basal feet and caps*)

Wie in Abb. 5 in gelb dargestellt, reichen seitlich vom Basalkörperchen trianguläre Strukturen mit einer kappenartigen Struktur ins Cytoplasma. Diese modifizierten zentriolären subdistalen Anhängen an den Mikrotubuli-Triplets des Basalkörperchens (Nachury et al., 2010, Anderson, 1972) dienen als Andockstationen für zytoplasmatische Mikrotubuli (Anderson et al., 2008; Sorokin 1962). So ist das primäre Zilium direkt mit dem Zytoskelett verbunden. Es ist bekannt, dass die zytoplasmatischen Mikrotubuli am gerichteten Transport von (membrangebundenen) Proteinen beteiligt sind. Beispielsweise werden intrazelluläre Vesikel mit Membranproteinen, welche für das äußere Segment der Photorezeptorzellen im Auge des Frosches bestimmt sind, entlang dieser zytoplasmatischen Mikrotubuli zu der Basis des Verbindungsziliums (vergleichbar mit primärem Zilium) transportiert, wo sie im Bereich der periziliären Membran andocken und fusionieren (Rosenbaum and Witman, 2002; Deretic and Papermaster, 1991). Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei primären Zilien, bzw. Basalkörperchen, welche diese ‚basalen Füßchen und Kappenstrukturen‘ besitzen, diese eine Rolle beim Proteintransport zum und eventuell ins primäre Zilium spielen.

### 2.3.3 ‚Gestreifte Wurzelfasern‘ (*Striated rootlets*)

Am proximalen Ende des Basalkörperchens ragen sog. ‚Wurzelfasern‘ in das Zytoplasma (Pitelka, 1974; Fawcett and Porter, 1954), die als stabilisierende Wurzeln des Basalkörperchens bzw. des primären Ziliums fungieren. Experimente, in welchen das Hauptprotein dieser Struktur, das Rootletin (Yang et al., 2002) deletiert wurde, zeigten, dass primäre Zilien ohne diese Wurzelstrukturen deutlich an Stabilität verlieren (Yang et al., 2005). Teilweise können diese auch ‚gestreifte Wurzelfasern‘ genannten Strukturen bis zum Golgi-Apparat reichen (Tachi et al., 1974). Diese Verbindung ließ lange Zeit die Vermutung zu, dass die ‚Wurzelfasern‘ wesentlich am Proteintransport zum primären Zilium beteiligt sind. Allerdings zeigten oben genannte Deletions-Experimente, dass auch ohne diese ‚Wurzelfasern‘ eine Ziliogenese stattfindet.

## 3 Transport von Membranproteinen

Im Gegensatz zum intraziliären Transport von Proteinen, dem sog. intraflagellaren Transport (IFT; s. 3.1) (Finetti et al., 2011; Ocbina et al., 2011; Baldari et al., 2010; Sedmak and Wolfrum, 2010; Qin et al., 2005; Rosenbaum and Witman, 2002; Orozco et al., 1999; Kozminski et al., 1993) ist der Transport von (Membran-)Proteinen und Lipiden in das und aus dem Zilium wenig bis gar nicht erforscht.

### 3.1 Intraflagellarer Transport (IFT)

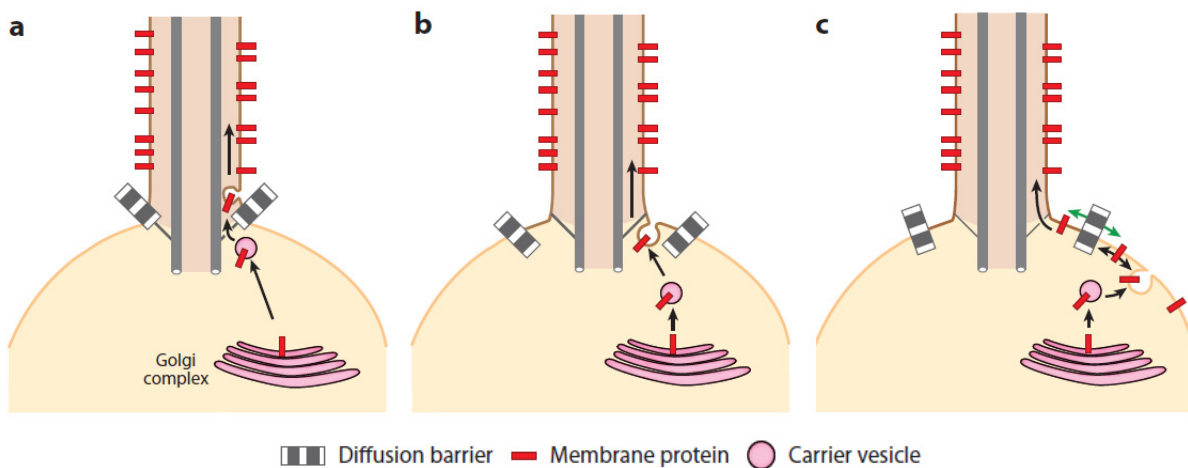
Sowohl bewegliche als auch die unbeweglichen primären Zilien werden über den intraflagellaren Transport (IFT) aufgebaut. Dieses bidirektionale Transportsystem (vgl. auch I.2.1) beruht auf dem Zusammenspiel vieler ziliärer Bausteine (z. B. Tubulin, ‚Radspeichen-Proteine‘ und periphere Membranproteine wie Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren) mit dem Gerüst bestehend aus den jeweiligen IFT-Proteinkomplexen (orthologe Komponenten bei *Chlamydomonas reinhardtii* und dem Menschen) zwischen den Mikrotubuli des Axonems und der ziliären Plasmamembran (s. I.2.1). Beim anterograden Transport zur Zilienspitze sind folgende Komponenten beteiligt: der IFT-Komplex B, bestehend aus 11 einzelnen Proteinen (Hauptproteine IFT88, IFT46 und IFT52) und das Motorprotein Kinesin-II, welches sich aus den zwei Untereinheiten KIF3a und KIF3b sowie einem Kinesin-assoziiertem Protein (KAP3) zusammensetzt. Für den entgegengesetzten retrograden Transport sind hingegen der IFT-Komplex A mit 6 IFT-Proteinen und als Motorprotein das zytoplasmatische Dynein 1b verantwortlich. Die Motorproteine laufen, beladen mit den IFT-Proteinkomplexen und den ziliären Bestandteilen, an den äußeren Mikrotubulipaaren des Axonems entlang (Baldari and Rosenbaum, 2010; Sloboda and Rosenbaum, 2007; Follit et al., 2006; Jurczyk et al., 2004; Scholey, 2003; Pazour et al., 2002; Rosenbaum and Witman, 2002; Cole et al., 1998; Piperno and Mead, 1997; Kozminski et al., 1993; Johnson and Rosenbaum, 1992; Rosenbaum and Child, 1967). Unklar ist hier bislang noch der Prozess der Ent- und Beladung an der Zilienspitze (Qin et al., 2004; Marshall and Rosenbaum, 2001).

### 3.2 Transport von Membranproteinen in das primäre Zilium

Im Gegensatz zu dem bereits gut erforschten intraflagellaren Transport ist, wie bereits erwähnt, über den Transport von Proteinen in das primäre Zilium bislang noch recht wenig bekannt (Westlake et al., 2011; Hu et al., 2010; Milenkovic et al., 2009).

Grundsätzlich enthält die Aminosäure-Sequenz eines Proteins zum einen mögliche Signale zum Transport eines Proteins in das endoplasmatische Retikulum oder zur Orientierung des Proteins in der Membran, und zum anderen auch noch Informationen über das Kompartiment, in das dieses Protein transportiert werden soll. Im Falle des integralen Membranproteins Polycystin-2 beinhalten die ersten 15 N-terminalen Aminosäuren ein sog. RVxP-Motiv, welches für den Proteintransport in das primäre Zilium benötigt wird (s. I.1.2.1; Geng et al., 2006). Die Erkennung und Modifizierung von Membranproteinen findet im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt, danach werden sie typischerweise in Vesikel verpackt und anschließend zum jeweiligen Organell transportiert, mit dessen Membran das Vesikel schließlich fusioniert. Betrachtet man nun den spezifischen geometrischen Aufbau (s. I.2.1) der periziliären Basis, d. h. den Übergang vom Zellkörper in das primäre Zilium, stellt sich die Frage, über welchen Transportweg Membranproteine in das primäre Zilium gelan-

gen. Die in den Modellen in Abb. 7 gezeigte, postulierte Diffusionsbarriere (Hu et al., 2010) stellt einen wesentlichen Diskussionspunkt bezüglich des Membranprotein-Transports dar. Experimente mit Dextran zeigten, dass nur Moleküle  $<10$  kDa diese passieren können (Jensen et al., 2004). Membranproteine des Ziliums sind allerdings deutlich größer (Polycystin-2: 110 kDa; González-Perrett et al., 2001; Cai et al., 1999). Daher ist davon auszugehen, dass spezifische Transportmechanismen für integrale Membranproteine ins ziliäre Kompartiment bestehen. In den Abbildungen 7 a – c sind die bis dato unterschiedlich diskutierten Möglichkeiten der Transportrouten schematisch dargestellt. Wie an den unterschiedlichen Positionen der schematisch dargestellten Diffusionsbarriere in den Abbildungen zu sehen ist, ist nicht bekannt, wo genau sich diese Barriere zwischen Zellkörper und ziliärem Kompartiment befindet und in welcher Form sich diese gestaltet. Es stellt sich auch die Frage, ob tatsächlich eine solche Barriere existiert.



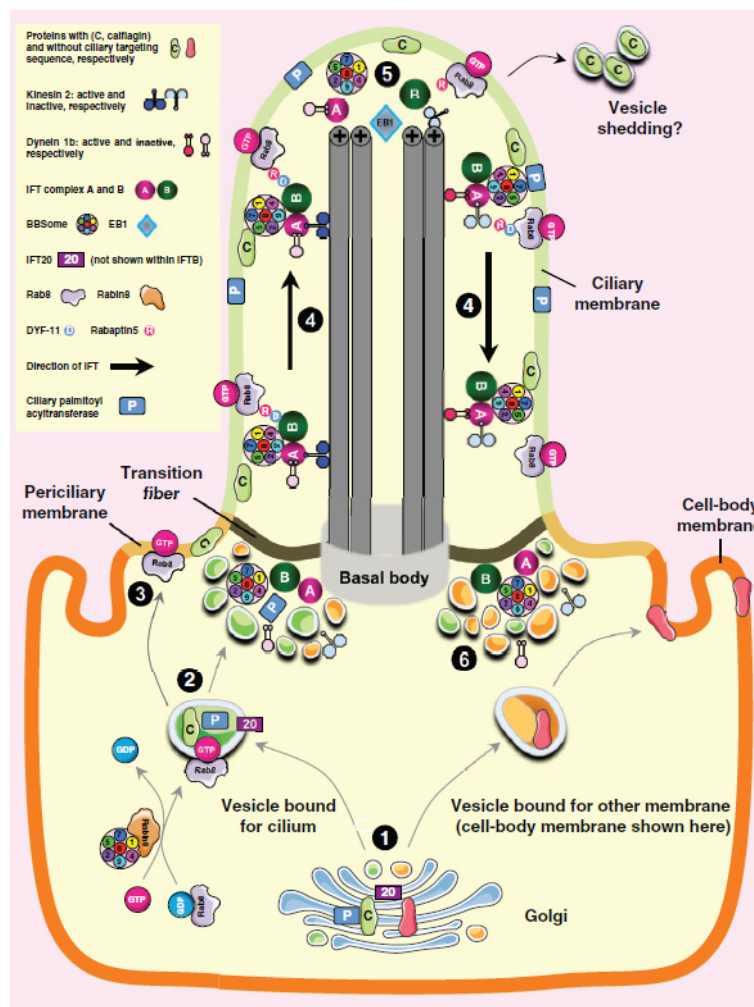
**Abb. 7: Drei mögliche Transportrouten von integralen Membranproteinen in das primäre Zilium (modifiziert Nachury et al., 2010; Abb. 4).** Alle Modelle zeigen mögliche Anordnungen der Diffusionsbarriere an der Basis des primären Ziliums bzw. im periziliären Bereich (Reiter and Mostov, 2006). In den ersten beiden Abbildungen sind zwei unterschiedliche Variationen des gerichteten Transports von Post-Golgi Vesikeln zur ziliären Basis gezeigt. **a)** Membranproteine wandern in Post-Golgi Vesikeln verpackt direkt in das primäre Zilium und fusionieren erst im Inneren mit dessen Membran. **b)** Hier ist die Diffusionsbarriere  $\sim 0,5 \mu\text{m}$  von der eigentlichen Basis des Ziliums entfernt. In diesem Bereich können die Vesikel andocken und mit der periziliären Membran fusionieren. **c)** Hier werden die in Vesikel gepackten Membranproteine zuerst zur Zyttoplasmamembran transportiert, bevor sie die Diffusionsbarriere (grüne Pfeile) durch laterale Diffusion passieren und ins primäre Zilium gelangen.

Nicht-membrangebundene Proteine, wie Strukturproteine des Axonems werden direkt zum ziliären Porenkomplex transportiert (Rosenbaum and Witman, 2002), wo sie an die IFT-Partikel (s. 3.1) gebunden und ins primäre Zilium transloziert werden. Obwohl die IFT-Partikel mit der ziliären Plasmamembran verbunden sind (Pigino et al., 2009), ist unbekannt, ob diese auch definitiv am Transport von Membranproteinen beteiligt sind. Für membrangebundene Proteine jedoch existieren, wie bereits erwähnt, verschiedene Transportrouten zum primären Zilium, welche (vermutlich) vom jeweiligen Protein abhängig sind.

Das integrale Membranprotein Rhodopsin gelangt beispielsweise in Vesikeln vom inneren in das äußere Segment der Photorezeptorzellen im Auge des Frosches, indem es nahe der Basis des Verbindungsziliums (vergleichbar mit primärem Zilium) in unmittelbarer Nähe zu den ‚Übergangsfasern‘ mit der apikalen Membran des inneren Segments fusioniert (vgl. Abb. 7b; Wolfrum and Schmitt, 2000; Papermaster et al., 1986; 1985). Nach erneuter Endozytose des Proteins wird es vermutlich an die erwähnten IFT-Partikel gebunden und in das ziliäre Kompartiment transportiert (Rosenbaum and Witman, 2002; Deretic and Papermaster, 1991).

Abweichend wird für das Membranprotein Smoothed ein lateraler Transport von der somatischen in die ziliäre Plasmamembran diskutiert (vgl. Abb. 7c; Francis et al., 2011; Milenkovic et al., 2009). Auch bei *Chlamydomonas* wurde ein solcher Transportmechanismus zwischen Plasma- und Zilienmembran beschrieben (Hunnicut et al., 1990).

Neben den oben erwähnten unterschiedlichen Transportmechanismen von integralen Membranproteinen liefert Abb. 8 eine detaillierte Übersicht über die molekularen Mechanismen, die bei den erwähnten Transportwegen eine Rolle spielen können (Emmer et al., 2010).



**Abb. 8: Molekulare Mechanismen beim Transport von (Membran-) Proteinen in das primäre Zilium (modifiziert Emmer et al., 2010; Abb. 1)** Obwohl sich Zilien verschiedener Zelltypen in kleinen Details

ihrer Strukturen, Funktionen und Mechanismen unterscheiden, haben sich einige prinzipielle Gemeinsamkeiten herausgestellt, welche hier zusammengefasst werden. Die ziliäre Membran (hellgrün) unterscheidet sich in ihrer Lipidzusammensetzung von der periziliären (hellbraun), als auch von der somatischen Plasmamembran (orange) (Tyler et al., 2009). Das primäre Zilium wird durch die ‚Übergangsfasern‘ (*transition fibers*), welche das Basalkörperchen mit der Zytoplasmamembran verbinden, vom Zellkörper getrennt. Am Ansatzpunkt der ‚Übergangsfasern‘ geht die periziliäre Membran in die Zilienmembran über (Sloboda and Rosenbaum, 2007; Reiter and Mostov, 2006). (1) Vesikel mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen werden im Golgi gebildet (Klemm et al., 2009; Ejsing et al., 2009; Schuck and Simons, 2004). Das Golgi-assoziierte Protein IFT20 ist mitunter für den Vesikeltransport der ziliären (Membran-) Proteine zuständig (Follit et al., 2006) (2) Solche Vesikel, die für das primäre Zilium bestimmt sind, interagieren mit GTP-Rab8, welches durch den GDP-GTP Austausch, wiederum katalysiert durch Rabin8 und den BBSom-Komplex, gebildet wird (Leroux, 2007). Dieser Vorgang unterstützt den Transport zur Zilienbasis nahe der ‚Übergangsfasern‘ (Hao and Scholey, 2009; Jin and Nachury, 2009; Omori et al., 2008); der molekulare Mechanismus ist allerdings nicht bekannt. (3) Vesikel fusionieren mit der periziliären Membran, worauf Lipide und Proteine ins Zilium gelangen können. Einige Vesikel sammeln sich an der Basis des Ziliums, was für die Bildung der ‚ziliären Halsband‘-Struktur (*ciliary necklace*) (Torikata, 1988; Gilula and Satir, 1972) verantwortlich sein könnte. (4) IFT-Komplexe, die aus den Protein-Komplexen IFT-A und IFT-B (s. 3.1) bestehen und wahrscheinlich mit dem BBSom-Komplex (Loktev et al., 2008; Ou et al., 2005) assoziiert sind, transportieren die Ladungen, wie eventuell auch die ziliären Membranproteine, entlang des Ziliums. Der BBSom-Komplex steht möglicherweise ebenfalls direkt mit der Zilienmembran in Kontakt (Nachury et al., 2010; Hao and Scholey, 2009). (5) IFT-Komplexe laden ihre Fracht an der Spitze des Ziliums ab. (6) Bereits umgesetzte Produkte werden zurück zur Zilienbasis transportiert und wiederverwendet.

Allen unterschiedlich diskutierten Transportmechanismen ist gemeinsam, dass jeweils ein Transport der Membranproteine in Vesikeln zur ziliären Basis eine Rolle spielt. Der in Abb. 6a gezeigte Fall, dass die Vesikel die hypothetische Diffusionsbarriere direkt an der Basis des Ziliums durchqueren, ist aufgrund der oben genannten Problematik der Größe der Membranproteine bzw. die mit Membranproteinen gepackten Vesikel unwahrscheinlich. Eine weitere hier nicht gezeigte Möglichkeit der Diffusion dieser Vesikel direkt in das Lumen des primären Ziliums bzw. in dessen Basalkörperchen wurde bis dato nicht in Erwägung gezogen.

## 4 Live cell imaging und Elektronenmikroskopie – kein Widerspruch

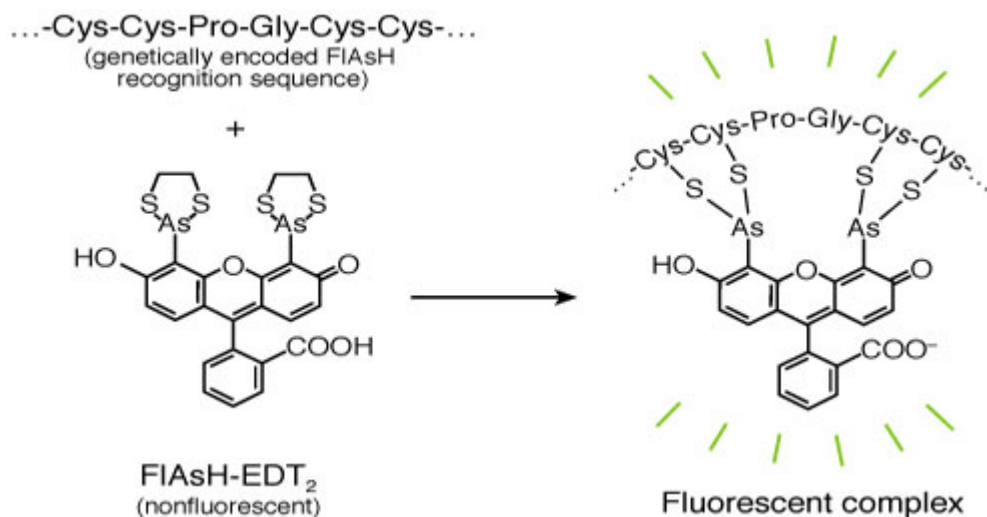
Es gibt mittlerweile viele verschiedene Methoden, um Proteine in lebenden Zellen zu visualisieren. In der Regel werden diese mit fluoreszierenden Antikörpern oder direkt mit fluoreszierenden Proteinen markiert. Das am häufigsten verwendete Protein ist das grün fluoreszierende Protein GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura, 2005; Shimomura et al., 1962). Mit einer Größe von ~27 kDa (238 Aminosäuren) können jedoch beim Fusionieren mit dem Zielprotein Konformationsänderungen auftreten, die die Struktur und das Verhalten des eigentlichen Proteins beeinflussen (Andresen et al., 2004; Lisenbee et al., 2003). Daher wurden Methoden entwickelt, bei denen die GFP-Varianten durch kleine Fluorophore ersetzt werden. In der Arbeitsgruppe von Roger Tsien (UCSD, Institut für Pharmakologie, Institut für Chemie und Biochemie; San Diego), der unter anderem auch einen Nobelpreis für die „Entdeckung und Weiterentwicklung von GFP“ erhalten hat, wurden biarsenische Fluorophore (s. 4.1 und 4.2; Machleidt et al., 2007) entwickelt,



die spezifisch an ein sog. Tetracystein-Motiv (TCM) binden (Griffin et al., 1998). Dieses Motiv ist eine Peptidsequenz bestehend aus sechs Aminosäuren (<1 kDa), wobei die Aminosäuren Prolin und Glycin durch jeweils zwei Cysteine flankiert werden (CCPGCC) (Hoffmann et al., 2005). Die Aminosäuren Prolin und Glycin sorgen in dem Tetracystein-Motiv für eine haarnadel-ähnliche Struktur, an die die Fluorophore FIAsh (s. 4.1) und ReAsH (s. 4.2) binden können (Griffin et al., 1998; Adams et al., 2002). Beim Klonieren dieses TCM in die Sequenz des Zielproteins birgt diese kleine Sequenz im Gegensatz zum GFP weniger die Gefahr, die Konformation des Proteins zu verändern. Weiterhin kann das Tetracystein-Motiv sowohl an verschiedenen Stellen als auch in mehrfacher Ausführung in das Protein eingeführt werden, (Andresen et al., 2004).

#### 4.1 *In-vivo*-Färbung mittels FIAsh

Bei dem Fluorophor FIAsh (Fluorescein Arsenical Hairpin Binder) handelt es sich um die lipophile und somit membrangängige Verbindung 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein, welches gebunden an die CCPGCC-Tetracystein-Sequenz grün fluoresziert (s. Abb. 9).



**Abb. 9: FIAsh-Labeling** (www.invitrogen.com). Erst nach spezifischer Bindung des selber nicht fluoreszierenden FIAsh-EDT<sub>2</sub> an die CCPGCC-Tetracysteinsequenz entsteht ein grün fluoreszierender Komplex.

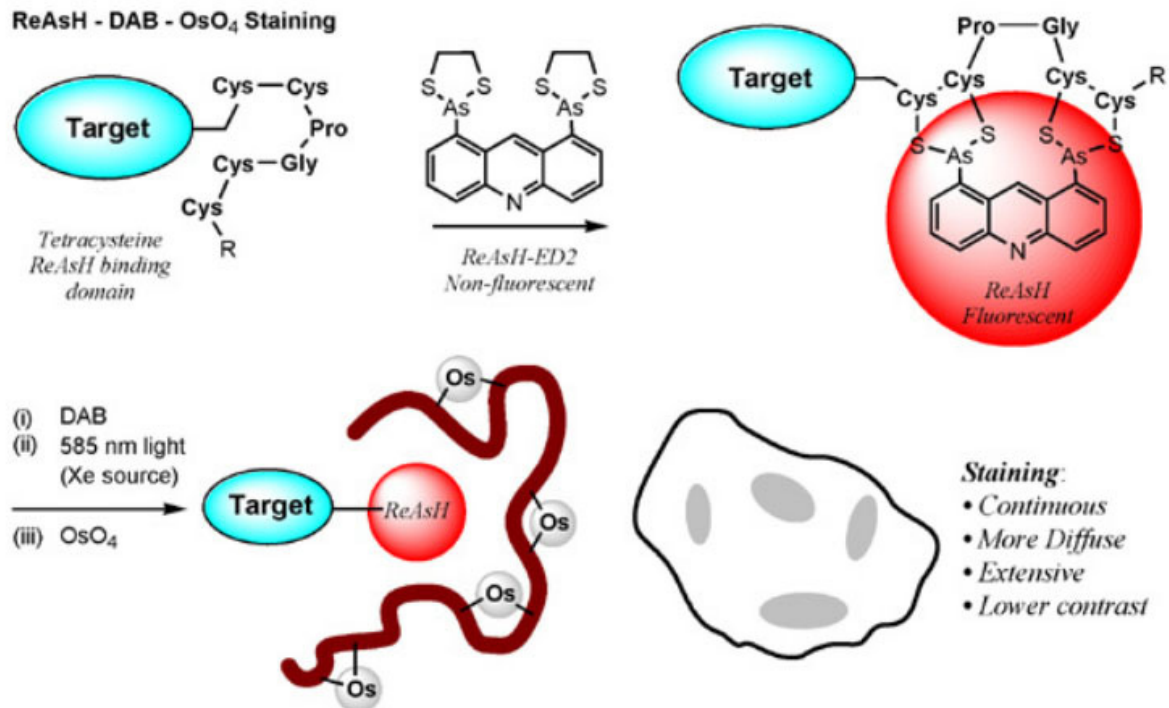
Nachdem dieses Reagenz auf die lebenden Zellen gegeben wird, kann das jeweilig markierte Zielprotein *in-vivo* im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und verfolgt werden. Überschüssiges Reagenz sowie unspezifisch gebundenes FIAsh kann mit einem Dithiol gebunden und entfernt werden.

#### 4.2 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH

Das Prinzip bei dem zweiten Fluorophor, dem sog. ReAsH (Resorufin Arsenical Hairpin Binder) ist das gleiche wie bei dem oben erklärten FIAsh. Allerdings hat dieses Resorufin-Derivat im Gegensatz zum FIAsh eine oxidierende Eigenschaft, die für die korrelative Licht- und Elektronenmikros-



kopie genutzt werden kann. Mit dem Prinzip der Photooxidation lassen sich die fluoreszierenden Proteine auch im Elektronenmikroskop nachweisen und ihre Lokalisation mit höherer Auflösung untersuchen (s. Abb. 10).



**Abb. 10: ReAsH-DAB-OsO<sub>4</sub> Färbung** ([www.nanoprobe.com/newsletters/Vol7\\_Iss6.html](http://www.nanoprobe.com/newsletters/Vol7_Iss6.html)). ReAsH-EDT<sub>2</sub> bindet spezifisch an das CCPGCC-Tetracystein-Motiv und reagiert zu einer rot fluoreszierenden Verbindung. Nach Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) und Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge wird ein osmiophiles Polymer gebildet.

Zur Durchführung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie stehen geeignete Verfahren der Probenpräparation zur Verfügung. So werden die Zellen in dafür geeigneten Kulturschalen kultiviert, welche mit einem Koordinatensystem versehen sind, um die Wiederfindung von den Strukturen für die Elektronenmikroskopie zu erleichtern.

## 5 3D-Visualisierung mittels Elektronentomographie von hochdruckgefrorenen Proben

Die Elektronenmikroskopie ist eine wichtige Untersuchungsmethode für zellbiologische Forschungsvorhaben. Sie ermöglicht für die wichtigsten molekularen Bestandteile von Zellen die hochauflösende Untersuchung ihrer Verteilung, also die Analyse der supramolekularen Organisation der Zelle. Allerdings sind elektronenmikroskopische Abbildungen zweidimensionale Bilder einer dreidimensionalen Probe, was einen Verlust von räumlichen Informationen zur Folge hat. Eukaryotische Zellsysteme sind im Gegensatz zu vielen prokaryotischen Organismen zu dick, um als Ganzes elektronenmikroskopisch durchstrahlt und somit untersucht werden zu können. Um dieses

Problem zu umgehen, werden Methoden der Probendisektion angewendet. Zum einen können manuell Serienschritte von dem biologischen Material hergestellt (Harris et al. 2006; Fuscaldo and Jones, 1959; Bang and Bang, 1957) und diese unter dem Elektronenmikroskop nacheinander betrachtet werden, um die Aufnahmen anschließend zu einem 3D-Datensatz zusammenzufassen. Um die Auflösung in der dritten Dimension der Proben zu erhöhen, können die Serienschritte einer Elektronentomographie (Höög et al., 2007; Lucić et al., 2005; Baumeister et al., 1999; Frank, 1992) unterzogen werden, was einer erneuten Probendisektion entspricht; d. h. im Elektronenmikroskop wird von den einzelnen Schnitten eine Serie von Bildern unter verschiedenen Kippwinkeln angefertigt. Diese Datensätze werden dann mittels diverser Computerprogramme (IMOD, TOM) rekonstruiert; anhand des fertigen Tomogramms wird z. B. in AMIRA® das dreidimensionale Modell der betrachteten Probe visualisiert. Um neben der dreidimensionalen Information zusätzlich auch noch eine bestmögliche Erhaltung des biologischen Materials zu gewährleisten, werden die Zellen statt einer Artefakt-behafteten chemischen Fixierung (Griffith et al., 1993; Graham and Beveridge, 1990) mithilfe des Hochdruckgefrierens fixiert (McDonald and Auer, 2006; Studer et al., 1989; Dahl and Staehelin, 1989; Moor, 1987), gefriersubstituiert (Ripper et al., 2008; Feder and Sidman, 1958) und für die Ultramikrotomie in Kunstharz eingebettet.

## 6 Zielsetzung der Arbeit

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem antennenartigen Zellorganell von renalen Tubulus-Epithelzellen, dem primären Zilium (s. 2). Wie aus vorherigen Kapiteln ersichtlich ist, konnten bislang noch keine sicheren Aussagen zum Proteintransport von membrangebundenen Proteinen in das primäre Zilium getroffen werden. Hier wurde das ziliär lokalisierte Transmembranprotein Polycystin-2 (PC2; s. 1.2) als Modell zur Untersuchung von Transportvorgängen in das Zilium verwendet. Damit sollte die Tetracystein-basierte Protein-Detektionsmethode mittels FIAsh und ReAsH (s. 4) etabliert werden. Zum einen kann das Protein damit unter dem Fluoreszenzmikroskop *in-vivo* betrachtet und seine Translokation in der Zelle verfolgt und zum anderen nach erfolgter Photooxidation dasselbe Protein im Elektronenmikroskop mit höherer Auflösung analysiert werden. Des Weiteren wurde ein weiteres Werkzeug der Elektronenmikroskopie zur morphologischen Charakterisierung der Ultrastruktur der basalen Zilienstruktur verwendet. Hierfür sollten die renalen Epithelzellen mittels Hochdruckgefrieren in möglichst nativem Zustand fixiert, anschließend gefriersubstituiert und in Kunstharz eingebettet werden. Die Anfertigung von Serienschritten und elektronenmikroskopischen Tomographien und deren Rekonstruktion zur 3D-Visualisierung der ziliären Basis sollten Aufschluss über die Ultrastruktur in diesem Bereich geben und eventuell zusätzlich weitere Erkenntnisse zum Proteintransport von (membrangebundenen) Proteinen in das primäre Zilium liefern. Insbesondere galt ein Augenmerk der Suche nach möglichen Vesikeln im basalen Bereich der ‚Übergangszone‘ des primären Ziliums.

## II Material und Methoden

### 1 Materialien

#### 1.1 Chemikalien

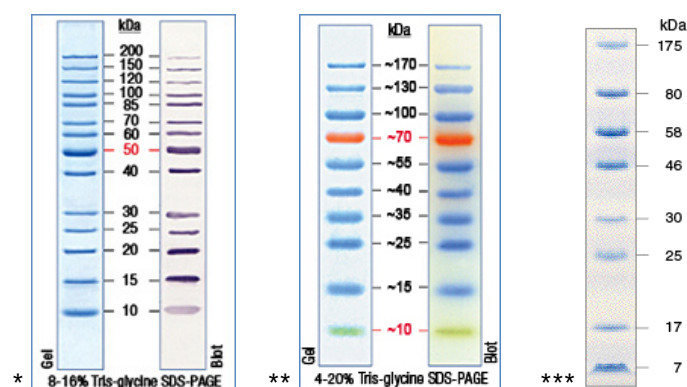
Substanz	Hersteller
Aceton; p.a.	Acros Organics, New Jersey (USA)
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösungen (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Bacto-Trypsin	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Bleicitrat	Plano, Wetzlar
BSA; Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Chloroform; p.a.	Acros Organics, New Jersey (USA)
Chloroquin Diphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Hydrat)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
DEAE-Dextran Hydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
2,3-Dimercapto-1-propanol	Fluka, Buchs (CH)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Doxyzyklin	Applichem, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
1,2-Ethandithiol	Fluka, Buchs (CH)
Ethanol; p.a.	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS/FBS (fetales Kälberserum)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
G-418 Sulphate (Geneticin)	PAA, Pasching (A)
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycin; p.a.	Riedel de Haën, Seelze
Glycerin	Fluka, Buchs (CH)
Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Kakodylsäure Natriumsalz	Fluka, Buchs (CH)
Kaliumcyanid	Fluka, Buchs (CH)
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel de Haën, Seelze
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	TSI, Zeven
MNA (Methylnadic anhydride)	Fluka, Buchs (CH)

OsO <sub>4</sub> (Osmiumtetroxid)	Science Services GmbH, München
Pioloform	Plano, Wetzlar
Poly-L-Ornithin	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
2-Propanol; p.a.	Acros Organics, New Jersey (USA)
Puromycin	PAA, Pasching (A)
ReAsH-EDT <sub>2</sub>	Invitrogen, Darmstadt
Roti®-Quant	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Tris; p.a.	USB, Cleveland (USA)
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin	PAA, Pasching (A)
Tween 20	Serva, Heidelberg
Uranylacetat	Serva, Heidelberg

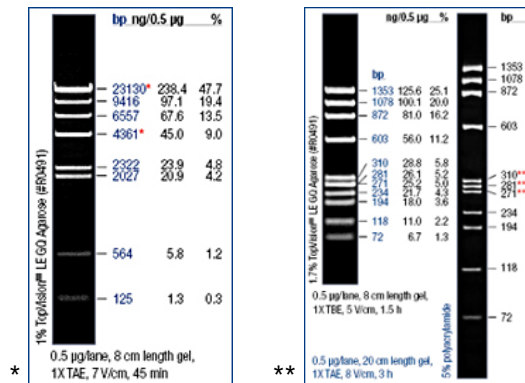
Alle weiteren Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a. Qualität bezogen. Alle für die Kultivierung benötigten Gase stammten von der Firma Linde Gas, Nürnberg.

## 1.2 Molekularmassenstandards

Protein-Massenstandard	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder *	Fermentas, St.Leon-Rot; SM0661
PageRuler™ Prestained Protein Ladder **	Fermentas, St.Leon-Rot; SM0671
Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) ***	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA); P7708S



DNA-Längenstandard	Hersteller
$\lambda$ DNA / Hind III Marker *	Fermentas, St. Leon-Rot; SM0101
$\Phi$ X174 DNA / BsuR I (Hae III) Marker **	Fermentas, St. Leon-Rot; SM0251



### 1.3 Enzyme/kommerzielle Puffer

Enzym/kommerzieller Puffer	Hersteller
BAP ( <i>Bacterial alkaline phosphatase</i> ): 150 U/ $\mu$ l	Invitrogen, Darmstadt
dNTP-Mix: NTPMX100, (10 mM each)	Qbiogene, Heidelberg
RNase A (lyophilisiert) $\rightarrow$ 1 $\mu$ g/ $\mu$ l in H <sub>2</sub> O lösen	Serva, Heidelberg
T4 DNA Polymerase: 3 U/ $\mu$ l	NEB, Ipswich (UK)
T4 DNA Ligase: 400 U/ $\mu$ l	NEB, Ipswich (UK)
<u>Restriktionsendonukleasen:</u>	
<i>Afl</i> II: 20 U/ $\mu$ l	NEB, Ipswich (UK)
<i>Bam</i> H I: 20 U/ $\mu$ l	NEB, Ipswich (UK)
<i>Bgl</i> II: 10 U/ $\mu$ l	NEB, Ipswich (UK)
<i>Eco</i> R I: 10 U/ $\mu$ l	Fermentas
<i>Hind</i> III: 10 U/ $\mu$ l	Fermentas
<i>Kpn</i> I: 10 U/ $\mu$ l	Fermentas
<i>Mre</i> I: 10 U/ $\mu$ l	Fermentas
<i>Nhe</i> I: 10 U/ $\mu$ l	Fermentas

<i>Sal</i> I: 20 U/μl	NEB, Ipswich (UK)
<i>Spe</i> I: 20 U/μl	NEB, Ipswich (UK)
<i>Xba</i> I: 20 U/μl	NEB, Ipswich (UK)
<i>Xma</i> I: 20 U/μl	NEB, Ipswich (UK)
<i>Xho</i> I: 10 U/μl	Fermentas

## 1.4 Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller
mouse anti-HA (12CA5), monoclonal	Hybridomzelllinie von J. Kyriakis (Field et al., 1988)
rabbit anti-HA , polyclonal	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
mouse anti-acetyliertes Tubulin (6-11B-1)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Cy3-goat-anti-mouse	Jackson Immuno Research / Dianova
Cy3-goat-anti-rabbit	Jackson Immuno Research / Dianova
FITC-goat-anti-mouse	ICN Biomedicals, Irvine (USA)
HRP-goat-anti-mouse	Sigma

## 1.5 DNA

### 1.5.1 Vektoren und Plasmid-DNA-Konstrukte

Nr. (lehrstuhl intern)	Vektoren	Größe kbp	Selektion	Beschreibung
#134	pcDNA3	5,4	Amp	enthält den CMV-Promotor und ein Neomycin-Resistenzgen
#171	pUC18/PKD2 [TM4FL], HA	6,6	Amp	Quelle: Lehrstuhl Prof. Witzgall
#176	pcDNA3/PKD2 [TM4FL], HA	8,5	Amp	Quelle: Lehrstuhl Prof. Witzgall
#178	pUHD10-3/PKD2 [TM4FL], HA	6,3	Amp	Quelle: Lehrstuhl Prof. Witzgall

#191	pEGFP-N3	4,7	Kan	enthält den CMV-Promotor, ein Neomycin-Resistenzgen und kodiert für eine verstärkt fluoreszierende Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i> ; Ziel-DNA wird N-terminal von EGFP-cDNA einkloniert
#277	pUHD10-3/GST-Hax-1 (1/181)	4,5	Amp	Quelle: Lehrstuhl Prof. Witzgall
#493	pEGFP-N1	4,7	Kan	enthält den CMV-Promotor, ein Neomycin-Resistenzgen und kodiert für eine verstärkt fluoreszierende Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i> ; Ziel-DNA wird N-terminal von EGFP-cDNA einkloniert
#657	pcDNA3/PKD2 (1/703), (KLF→AAA) (572-574 AS), HA	8,6	Amp	Quelle: Lehrstuhl Prof. Witzgall
#658	pcDNA3/PKD2 (1/703), (KFI→AAA) (575-577 AS), HA	8,6	Amp	Quelle: Lehrstuhl Prof. Witzgall
#678	pUC18/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP	6,5	Amp	Vektor: pUC18/TM4 FL, HA (5': XhoI / 3': KpnI); 6,4 kbp Oligonukleotide: #1629 & #1630 (s. II.1.5.2)
#685	pUC18/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP,v.2	6,4	Amp	Vektor: pUC18/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP (5': XbaI / 3': KpnI); 2,7 kbp Insert: pUC18/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP (5': XbaI / 3': SalI); 3,7 kbp Oligonukleotide: #1736 & #1737 (s. II.1.5.2)
#687	pUHD10-3/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP	6,6	Amp	Vektor: pUHD10-3/GST-Hax-1 (1/181) (5': XbaI / 3': XbaI); 3,2 kbp Insert: pUC18/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP, v.2 (5': XbaI / 3': XmaI); 3,4 kbp
#691	pUHD10-3/PKD2 (1/703), HA, FLN_TCM_MEP	6,6	Amp	Vektor: pUHD10-3/PKD2, HA, FLN_TCM_MEP (5': BglII / 3': AflII); 6,6 kbp Adapter-Oligonukleotide: #1782 & #1783 (s. II.1.5.2)
#698	pUHD10-3/PKD2 (1/703), (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM	6,6	Amp	Vektor: pUHD10-3/PKD2 (1/703), HA, FLN_TCM_MEP (5': SpeI / 3': BglII); 4,4 kbp Insert: pcDNA3/PKD2 (1/703), (KLF→AAA) (572-574 AS), HA (5': SpeI / 3': BglII); 2,2 kbp
#699	pUHD10-3/PKD2 (1/703), (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM	6,6	Amp	Vektor: pUHD10-3/PKD2 (1/703), HA, FLN_TCM_MEP (5': SpeI / 3': BglII); 4,4 kbp Insert: pcDNA3/PKD2 (1/703), (KFI→AAA) (575-577 AS), HA (5': SpeI / 3': BglII); 2,2 kbp
#726*	pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KFI→AAA) (575-575 AS), HA, TCM	6,9	Kan	Vektor: pEGFP-N1 (5': NheI / 3': XhoI); 4,7 kbp Insert: pUHD10-3/PKD2 (1/703), (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM (5': SpeI / 3': SalI); 2,2 kbp
#727*	pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM	6,9	Kan	Vektor: pEGFP-N1 (5': NheI / 3': XhoI); 4,7 kbp Insert: pUHD10-3/PKD2 (1/703), (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM (5': SpeI / 3': SalI); 2,2 kbp
#758*	pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM	6,9	Kan	Vektor: pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM (5': NheI / 3': BglII); 6,0 kbp Insert: pUHD10-3/PKD2 (1/703), HA, TCM (5': NheI / 3': BglII); 0,9 kbp

#723	pUHD10-3/PKD2, TCM (N), HA	6,4	Amp	Vektor: pUHD10-3/PKD2, HA (5': Mrel / 3': Mrel); 6,4 kbp Adapter-Oligonukleotide: #1890 & #1891 (s. II.1.5.2)
#794	pUHD10-3/PKD2, EGFP + TCM (N), HA	6,9	Amp	Vektor: pUHD10-3/PKD2, TCM (N), HA (5': Mrel / 3': Mrel); 6,2 kbp Insert: pEGFP-N3 (5': Mrel / 3': Mrel); 0,7 kbp Oligonukleotide: #2175 & #2176 (s. II.1.5.2)
#801*	pcDNA3/PKD2, EGFP + TCM (N), HA	9,1	Amp	Vektor: pcDNA3/PKD2, HA (5': BamHI / 3': BamHI); 7,3 kbp Insert: pUHD10-3/PKD2, EGFP+TCM (N), HA (5': BamHI / 3': BamHI); 1,8 kbp

**Tab. 1: Im Rahmen dieser Dissertation verwendete bzw. hergestellte Vektoren und Plasmid-DNA-Konstrukte.** Amp: Ampicillin / Kan: Kanamycin (\* für die in dieser Arbeit aufgeführten Transfektionen verwendet)

### 1.5.2 Oligonukleotide

Nr. (Lehrstuhlintern)	Name	Sequenz von 5' → 3'	T <sub>Schmelz</sub>
#1629	Tetracystein (FLN#MEP, upper)	TCGAGCTTAAGTTCCTGAACTGCTGCCCCGGCTGCT GCATGGAGCCCGTCGACTGAACGCGTGGTAC	93°C
#1630	Tetracystein (FLN#MEP, lower)	CACGCGTTCAGTCGACGGGCTCCATGCAGCAGCCG GGGCAGCAGTTCAGGAACTTAAGC	93°C
#1636	Tetracystein (FLN#MEP, upper)	CTTAAGTTCCTGAACTGCTGCCCCGGCTGCTGCATG GAGCCCGTCGACTGAACGCGTGCCAC	93°C
#1637	Tetracystein (FLN#MEP, lower)	ACGCGTTCAGTCGACGGGCTCCATGCAGCAGCCGG GGCAGCAGTTCAGGAACTTAAGG	92°C
#1655	HA-tag (PC2 FL) fw	ATTTGCAGATCTTTACCCATACGATGTTC	66°C
#1656	HA-tag (PC2 FL) rv	AGCGTAATCTGGAACGTCATATGG	64°C
#1657	TC-tag (PC2FL) fw	GACGTTCCAGATTACGCTTTCCTGAACTGCTGC	75°C
#1658	TC-tag (PC2 FL) rv	ATTTGCAGATCTTCAGTCGACGGGCTCC	72°C
#1736	Sall/KpnI, upper	TCGACTGAACGCGTGGTACCCCTAGGAGTAC	76°C
#1737	Sall/KpnI, lower	TCCTAGGGGTACCACGCGTTCAG	68°C
#1782	BglII/HA/AflII, upper	GATCTTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTC	73°C
#1783	BglII/HA/AflII, lower	TTAAGAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAA	70°C
#1890	TCM (NH <sub>2</sub> , upper)	CCGGCGATTCTGAACTGCTGCCCCGGCTGCTGCAT GGAGCC	88°C
#1891	TCM (NH <sub>2</sub> , lower)	CCGGGGCTCCATGCAGCAGCCGGGGCAGCAGTTCA GGAATCG	88°C
#2175	EGFP (upstream Mrel)	ATTTGCCGCCGGCGAATGGTGAGCAAGGGCG	79°C
#2176	EGFP (downstream Mrel)	ATTTGCCGCCGGCGCTTGACAGCTCGTCCATG	79°C

**Tab. 2: Oligonukleotide.**



## 1.6 Zellen

### 1.6.1 Bakterien

Name	Selektion	Beschreibung	Quelle
DH5α	-	Klonierstamm, aber auch als Expressionsstamm nutzbar (nur für Vektoren mit <i>tac</i> -Promotoren wie z. B. pGEX oder pMal)	Stratagene

**Tab. 3: Bakterienstamm.**

### 1.6.2 Immortalisierte Säuger-Zelllinien

Name	Selektion	Beschreibung	Quelle
COS-7	-	Fibroblasten-Zelllinie aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen; Zellen wurden stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert und produzieren daher das sog. T-Antigen	B. Royer-Pokora, Humangenetik, Heidelberg
HEK-293T	-	„Human Embryonic Kidney“-Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Abschnitten des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Zusätzlich exprimieren die Zellen das „SV40 Large T-Antigen“	E.V. Makeyer, Nanyang Technological University, Singapur
LLC-PK <sub>1</sub>	-	Epitheliale Zelllinie aus dem proximalen Nierentubulus vom Schwein	J. Bonventre, MGH, Boston
LtTA-2,22	G-418	LLC-PK <sub>1</sub> -Zellen mit konstitutiver Synthese des Tetrazyklin-Transaktivators (tTA), vermittelt durch die CMV-Promotorsequenz auf dem sog. regulatorischen Plasmid (pUHD15-1neo; G-418-Resistenz); tTA stellt ein Fusionsprotein aus dem an den Tetrazyklin-Operator bindenden Tetrazyklin-Repressor (tetR) und dem VP16-Protein dar; Tetrazyklin kann an tTA binden und dadurch eine Konformationsänderung des Proteins auslösen, die ein Binden des Fusionsproteins an den Tetrazyklin-Operator unmöglich macht; hierdurch kann die Transkription einer Ziel-DNA-Sequenz, die sich unter der Kontrolle eines tetrazyklin-Operators und eines nachgeschalteten Minimal-CMV-Promotors befindet, unterbunden werden; nach Entfernen von Tetrazyklin ist das Fusionsprotein wieder in der Lage an die Operatorsequenz zu binden, um die Transkription zu aktivieren. An Stelle von Tetrazyklin wurde in dieser Arbeit sein Derivat Doxzyklin verwendet, da dieses eine vergleichsweise deutlich höhere Affinität zu tetR aufweist und somit in erheblich niedrigeren Konzentrationen verwendbar ist; letzterer Aspekt wirkt sich wiederum positiv aus, da somit die zelltoxischen Auswirkungen reduziert werden können.	Institutseigene Herstellung
LtTA-2,22/PKD2 FL, HA Klon 5	G-418 Puromycin	LtTA-2,22-Zelllinie, die stabil mit pUHD10-3/PKD2 FL, HA und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxzyklin regulierbare Synthese von PK2 FL, HA möglich	Dr. sc. hum. A. Cedzich; (Cedzich, 2000)
LtTA-2,22/PKD2 (1/703), HA Klon 7	G-418 Puromycin	LtTA-2,22-Zelllinie, die stabil mit pUHD10-3/PKD2 (1/703), HA und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxzyklin regulierbare Synthese von PK2 (1/703), HA möglich	Dr. sc. hum. A. Cedzich; (Cedzich, 2000)

LtTA-2,22/PKD2 FL, HA, eGFP Klon 39 & 12	G-418 Puromycin	LtTA-2,22-Zelllinie, die stabil mit pUHD10-3/PKD2 FL, HA, eGFP und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxzyklin regulierbare Synthese von PC2 FL, HA, EGFP möglich	Dr. H. Hoffmeister
LtTA-2,22/PKD2 (1/703), HA, eGFP Klon 14	G-418 Puromycin	LtTA-2,22-Zelllinie, die stabil mit pUHD10-3/PKD2 (1/703), HA, eGFP und pBabePuro (Puromycin-Resistenz) transfiziert wurde: über Doxzyklin regulierbare Synthese von PC2 (1/703), HA, eGFP möglich	Dr. H. Hoffmeister

**Tab. 4: Säuger-Zelllinien****1.7 Kits**

Kits	Hersteller
TC-FIAsh™ II In-cell Tetracysteine Tag Detection Kit *green fluorescence* *for live-cell imaging*	Invitrogen
TC-ReAsH™ II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kit *red fluorescence* *for live-cell imaging*	Invitrogen
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification	Promega
Epoxy Embedding Medium kit	Fluka, Buchs (CH)
Durcupan™ Set for 1 l embedding mixture	Fluka, Buchs (CH)

## 2 Molekulargenetische Methoden

### 2.1 Aufreinigung von Plasmiden

#### 2.1.1 Plasmid-DNA-Minipräparation aus *E. coli*

verwendete Lösungen	
LB-Medium (inkl. entspr. Antibiotikum)	s. II.2.5.1
GTE-Puffer	50 mM Glukose 25 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
RNase A	1 µg/µl in H <sub>2</sub> O lösen → 10 min bei 100°C inkubieren → Lagerung bei -20°C
Alkali-SDS-Lösung	0,2 M NaOH 1% SDS → immer frisch ansetzen
Kaliumacetat-Lösung	5 M Kaliumacetat mit 5 M Essigsäure titrieren bis pH 4,8
Ethanol	100% und 70% in H <sub>2</sub> O → Lagerung bei -20°C
H <sub>2</sub> O	→ autoklaviert

Für die Plasmid-DNA-Minipräparation wurden 5 ml LB-Medium (inkl. entsprechender Antibiotika-Konzentration) mit Bakterien einer Kolonie oder einer Glyzerin-Stammkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 Upm inkubiert (s. II.2.5.1).

Je 1,5 ml der Übernachtskulturen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und ca. 20 sek bei 13.000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurde das Zellpellet in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert, mit 1 µl RNase A-Lösung versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Alkali-SDS-Lösung zugegeben, durch Schwenken gemischt und maximal 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150 µl kalter Kaliumacetat-Lösung wurde für ~1 sek gevortext (Vortex-Genie 2, Stufe 10) und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt und der Überstand dann mit 900 µl eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt und vermischt. Nach einer mindestens 30-minütigen Inkubation (ggf. auch mehrere Stunden) auf Eis, wurden die Proben 30 min bei 4°C und 14.000 Upm abzentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet jeweils mit 900 µl 70%igem Ethanol resuspendiert und erneut 5 min bei RT und 13.000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes

wurden die DNA-Pellets bei RT oder 37°C luftgetrocknet und anschließend in 35 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Nachfolgend wurde die Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt (s. II.2.2) und durch einen Restriktionsverdau getestet.

### 2.1.2 Plasmid-DNA-Midipräparation aus *E. coli*

<b>verwendete Lösungen</b>	
LB-Medium (inkl. entspr. Antibiotikum)	s. II.2.5.1
Wizard <i>Plus</i> Midiprep-Kit	von Promega bezogen
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert →bei 65°C inkubieren

Für die Plasmid-DNA-Midipräparation wurden 100 ml LB-Medium (inkl. entsprechendem Antibiotikum) mit Bakterien einer Glycerin-Stammkultur (s. II.2.5.1) oder einer ‚Minipräparations-Übernachtskultur‘ (s. II.2.1.1) angeimpft und bei 37°C und 250 Upm über Nacht angezogen.

Die Übernachtskultur wurde in zwei 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße überführt und 20 min bei 4°C und 2.500 Upm (Heraeus Multifuge 3SR Plus mit TTH-750 High-Capacity Swing-Out Rotor) abzentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Abgiessen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml Resuspensionspuffer vollständig gelöst, nach Zugabe von 3 ml Lysepuffer durch vorsichtiges Schwenken gemischt und für maximal 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 3 ml Neutralisationspuffer zugegeben und erneut durch Schwenken gemischt. Anschließend folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14.000 Upm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Der Überstand wurde durch ein Kleenex-Tuch gefiltert, mit 10 ml gut resuspendiertem DNA-Bindepuffer versetzt und vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde dann auf eine im Kit enthaltene Plastiksäule überführt, die auf einem Vakuumgestell montiert und an eine Wasserstrahlpumpe gekoppelt wurde. Das Vakuum wurde anfangs so gering wie möglich gehalten, um beim Durchlaufen der Säule ein effizientes Binden der DNA zu gewährleisten. Bei zwei anschließenden Waschschritten mit je 15 ml Waschlösung wurde das Vakuum erhöht. Abschließend wurde die Säule für 30-60 sek durch maximale Vakuumpumpenleistung getrocknet. Die DNA-enhaltenden Säulenteile wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 13.000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Säule 1 min mit 300 µl 65°C warmen autoklaviertem H<sub>2</sub>O inkubiert. Die Elution der DNA wurde durch Zentrifugation der Säule für 20 sek bei 13.000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) erreicht. Nachfolgend wurde die Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt (s. II.2.2) und durch einen Restriktionsverdau (s. II.2.3) die DNA getestet.

## 2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Dazu wurde die DNA zuvor mit H<sub>2</sub>O 1:20 (v:v) verdünnt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer mit H<sub>2</sub>O als Referenz. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 50 ng/μl doppelsträngiger DNA (Chargaff and Davidson, 1955). Die Konzentration errechnete sich daher wie folgt:

$$c[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} \times 20 \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Um die Reinheit der präparierten DNA zu überprüfen, wurde zusätzlich die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Dies gibt Aufschluss über eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen. Bei reiner DNA sollte der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

## 2.3 Agarosegelelektrophorese

verwendete Lösungen	
50x TAE-Puffer	2 M Tris 0,1 M EDTA → mit 1 M HCl auf pH 8,0 titrieren
1x TAE-Puffer	1: 50 Verdünnung von 50x TAE-Puffer in H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromid	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
5x Probenpuffer	15% Ficoll 400 (w/v) 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0 0,5% SDS (w/v) 0,125% Bromphenolblau (w/v)
Molekulargewichtsstandard	40 μl λ Lamda DNA/Hind III Marker (0,5 mg/ml) 40 μl ΦX174 DNA/BsuR I ( <i>Hae</i> III) Marker (0,5 mg/ml) 400 μl 5x Probenpuffer → mit H <sub>2</sub> O auf 2 ml auffüllen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuregemischen wurden standardmäßig 1%ige Agarose-Gele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach raschem Abkühlen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 μg/ml zugegeben und durch Schwenken vermischt. Anschließend wurde die Lösung luftblasenfrei in die vorbereitete Gelapparatur [kleine Gele: Agarose-Gelelektrophorese Minisystem (25 ml) ‚Horizon58‘, GIBCO BRL; große bzw. präparative Gele: Agarose-Gelelektrophorese Midisystem (150 ml) ‚Easy-Cast‘, Owl Scientific] gegossen und bei RT ausgehärtet. Die jeweilige Gelapparatur wurde mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 5x Probenpuffer (1 + 4, v/v) versetzt und nach Entfernen des Gelkammes vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid als interkalierendes

Agens konnte die DNA auf einem UV-Leuchtschirm detektiert und dokumentiert werden (Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationssystem Gel Max). Größe und Menge an geladener DNA wurde durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration bestimmt.

Für den Einsatz von präparativen Gelen wurden je nach dem zu ladenden Probenvolumen entsprechend viele Geltaschen mit Klebeband abgeklebt. Die Elektrophorese erfolgte zur besseren Fragmentauftrennung bei ~100 V. Für die anschließende Elektroelution (s. II.2.3.1) wurden die DNA-Banden auf dem UV-Leuchtschirm mit einem Skalpell ausgeschnitten.

### 2.3.1 Elektroelution

#### verwendete Lösungen

1x TAE-Puffer	s. II.2.3
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

Um die in den ausgeschnittenen Gelstücken enthaltene DNA zu erhalten, wurde eine Elektroelution durchgeführt. Dazu wurde ein in H<sub>2</sub>O gespülter Dialyseschlauch an einem Ende verschlossen und mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Nach dem Transfer des ausgeschnittenen Gelstücks in den Dialyseschlauch wurde dieser fest verschlossen und in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (s. II.2.3) gespannt. Die Elektroelution erfolgte 1 h bei 100 V, wobei am Schluß für ~30 sek umgepolt wurde, um eventuell an der Membran haftende DNA abzulösen. Anschließend wurde die DNA-haltige Pufferlösung in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und das Gelstück auf eventuelle Rest-DNA auf dem UV-Schirm kontrolliert. Falls nötig wurde die Elektroelution für weitere 30 min wiederholt.

## 2.4 Arbeiten zur Klonierung

### 2.4.1 Aufkonzentrierung von DNA

#### verwendete Lösungen

Elutionspuffer	0,2 M NaCl 1 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 7,4
Ladepuffer	1 M NaCl 1 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 7,4
Ethanol	100% p. a.
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

Um die durch Elektroelution erhaltene DNA in ein geringeres Volumen aufzukonzentrieren, wurden sog. Elutip-Säulen verwendet. Diese wurden erst mit 3 ml Elutionspuffer und dann mit 3 ml Ladepuffer equilibriert. Anschließend wurde die DNA-haltige Lösung (s. II.2.3.1) aufgetragen und langsam durch die Säule gedrückt. Durch Zugabe von 450 µl Elutionspuffer wurde die DNA aus der Säule eluiert und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Mischen mit 1 ml eiskaltem 100%igem Ethanol. Die DNA wurde 30 min bei 4°C und 14.000 Upm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) zentrifugiert und dadurch pelletiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das DNA-Pellet bei RT oder 37°C luftgetrocknet und je nach Pelletgröße in 10-25 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Menge an DNA wurde entweder photometrisch (s. II.2.2) oder über ein Agarose-Gel (s. II.2.3) bestimmt.

#### 2.4.2 Restriktionsverdau von DNA

verwendete Lösungen	
10x Reaktionspuffer	von NEB bzw. Fermentas bezogen
Pufferzusätze wie z.B. BSA	von NEB bzw. Fermentas bezogen
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

Zur Überprüfung der präparierten DNA wurde diese mittels Restriktionsverdau getestet. Dazu wurden Restriktionsendonukleasen in den mitgelieferten Puffern entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt neben der DNA 1/10 Volumenanteil des 10x Reaktionspuffers bezogen auf das Reaktionsvolumen und 2-6 U Enzym pro eingesetzter Menge an Plasmid-DNA. Um eine mögliche Staraktivität zu verhindern wurde nie mehr Enzym eingesetzt als 10% des Endvolumens; folglich betrug die Glyzerin-Endkonzentration nicht mehr als 5%. Je nach Herstellerangaben wurden noch Zusätze wie BSA zugegeben und schließlich mit H<sub>2</sub>O zum entsprechenden Endvolumen aufgefüllt. Die Inkubation des Verdauansatzes erfolgte für eine bis mehrere Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen optimalen Temperatur. Zur Kontrolle der Restriktionsverdau wurde im Anschluss eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

#### 2.4.3 Herstellung von „glatten Plasmid-DNA-Enden“

Für bestimmte Klonierungsversuche wurden statt der überhängenden Enden („sticky-ends“) glatte Enden („blunt-ends“) benötigt. Dafür wurden je nach Versuchsanordnung entweder die Klenow DNA Polymerase oder die T4 DNA Polymerase verwendet.

### Klenow DNA Polymerase

Dieses Enzym eignet sich zum Auffüllen 5'-überhängender Enden. Es war darauf zu achten, dass die Reaktionspuffer des vorausgegangenen Restriktionsverdau mit den Reaktionsbedingungen für die Klenow DNA Polymerase übereinstimmen.

#### **verwendete Lösungen**

Klenow DNA Polymerase	5 U/μl
dNTP-Mix	10 mM dATP / 10 mM dGTP / 10 mM dCTP / 10 mM dTTP
5x Probenpuffer	s. II.2.3

Bei der Verwendung der Klenow DNA Polymerase zur Herstellung glatter DNA-Enden wurden pro μg DNA 0,2-0,5 U des Enzyms und dNTPs in einer Enkonzentration von 50 μM zugegeben. Zur Reaktion wurde die Lösung 30 min in einem Wasserbad bei 25°C inkubiert.

### T4 DNA Polymerase

Dieses Enzym eignet sich entweder zum Entfernen 3'-überhängender Enden oder zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden. Hierbei war ebenfalls darauf zu achten, dass die Reaktionspuffer des vorausgegangenen Restriktionsverdau mit den Reaktionsbedingungen für die T4 DNA Polymerase übereinstimmen.

#### **verwendete Lösungen**

T4 DNA Polymerase	3 U/μl
dNTP-Mix	10 mM dATP / 10 mM dGTP / 10 mM dCTP / 10 mM dTTP
5x Probenpuffer	s. II.2.3

Bei der Verwendung der T4 DNA Polymerase zur Herstellung glatter DNA-Enden wurden pro μg DNA 1-2 U des Enzyms und dNTPs in einer Enkonzentration von 100 μM zugegeben. Zur Reaktion wurde die Lösung 15 min in einem Wasserbad bei 12°C inkubiert.



#### 2.4.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mittels bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP)

Für bestimmte Klonierungsversuche war es notwendig phosphorylierte DNA-Enden zu dephosphorylieren, z. B. um zu verhindern, dass präparativ verdaute Vektor-DNA religiert. Hierzu wurde die bakterielle alkalische Phosphatase (BAP) verwendet. Es war darauf zu achten, dass die Reaktionspuffer des vorausgegangenen Restriktionsverdaus mit den Reaktionsbedingungen der BAP übereinstimmten.

##### verwendete Lösungen

BAP	75 U/10 µg Vektor-DNA
5x Probenpuffer	s. II.2.3

Zur Dephosphorylierung wurden pro 10 µg Vektor-DNA 75 U des BAP-Enzyms zu dem vorhergegangenen Verdauansatz zugegeben und die Lösung für 1 h bei 65°C inkubiert (Heizblock VLM LS1). Dazwischen wurde kurz für 10 sek bei 13000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) zentrifugiert, um gebildetes Kondenswasser der Reaktion zurückzuführen. Zum Stoppen der Reaktion wurde eine entsprechende Menge an 5x Probenpuffer zugegeben.

#### 2.4.5 Ligation

Bei der Ligation werden mittels Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Enden neu kombiniert; d. h. am geöffneten Plasmidring aus dem Restriktionsansatz soll sich optimalerweise die einzuklonierende DNA mit den komplementären Enden anlagern. Dies geschieht zuerst durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, danach durch kovalente Bindungen über das Enzym T4-DNA-Ligase: Phosphodiester-Bindung zwischen der freien 5-Phosphatgruppe und der freien 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Das linearisierte Plasmid soll sich dann wieder zu einem Ring schließen.

**verwendete Lösungen**

T4-DNA-Ligase	400 U/μl
10x Reaktionspuffer	von NEB bezogen
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

Für eine Ligationsreaktion wurden je nach zur Verfügung stehender Vektor-DNA-Menge 20-150 ng elektroelierter DNA (s. II.2.3.1) eingesetzt. Die Menge der Insert-DNA errechnete sich dabei wie folgt:

Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden

Das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA sollte ~ 1:5 betragen.

$$\text{Menge der eingesetzten Vektor-DNA in ng} \times \frac{\text{Größe der Insert-DNA in bp} \times 5}{\text{Größe der Vektor-DNA in bp}}$$

Ligation von glatten Enden

Hierbei sollte das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA ~1:10 betragen.

$$\text{Menge der eingesetzten Vektor-DNA in ng} \times \frac{\text{Größe der Insert-DNA in bp} \times 10}{\text{Größe der Vektor-DNA in bp}}$$

Die entsprechenden Mengen an Vektor- und Insert-DNA wurden zusammen pipettiert. Anschließend wurden 1 μl der T4 DNA Ligase und 1 μl 10x Reaktionspuffer zugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 10 μl aufgefüllt. Zur Reaktion wurde der Ligationsansatz über Nacht im Kühlraum in einem auf 15-17°C temperierten Wasserbad inkubiert.

**2.4.6 Sequenzierung**

Bei der Sequenzierung der DNA wird die Reihenfolge der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül bestimmt. Dies wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Hierfür wurden 50-100 ng/μl Plasmid-DNA einer Midi-Präparation (s. II.2.1.2) in einem Mindestvolumen von 15 μl (in H<sub>2</sub>O) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß verschickt. Ein eventuell benötigter Sequenzierprimer wurde in einer Konzentration von 2 pmol/μl ebenfalls in einem Mindestvolumen von 15 μl (in H<sub>2</sub>O) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mitgeschickt.

## 2.5 Arbeiten mit Bakterien

### 2.5.1 Kultivierung und Lagerung

Die Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklavierten Materialien und Lösungen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden sterilfiltriert.

Medium & Lösungen	Herstellung	Endkonzentration
LB-Medium (Ausubel et al., 2007)	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1.000 ml mit H <sub>2</sub> O	
Ampicillin	50 mg/ml →sterilfiltrieren	500 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml →sterilfiltrieren	30 µg/ml

Die Anzucht von Bakterien für sog. Übernachtskulturen erfolgte ausgehend von einer Stammkultur in Glycerin (Lagerung bei -80°C) oder einer Kolonie. Das angeimpfte Kulturmedium enthielt die für den verwendeten Bakterienstamm entsprechende Antibiotika-Konzentration und wurde bei 37°C und 250 Upm (Inkubationsschüttler Unitron) inkubiert.

### 2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Durchführung von Transformationen wurden entsprechende kompetente Zellen hergestellt. Für die chemische Transformation von Bakterien wurde dafür das TSS-Protokoll angewandt. Die Transformation mittels Elektroporation bedurfte elektrokompenter Zellen.

TSS-Protokoll (Chung et al., 1989)

Puffer und Medium	Herstellung
LB-Medium	s. II.2.5.1
TSS-Puffer	10% PEG 3350, 5% DMSO, 25 mM MgSO <sub>4</sub> in LB-Medium →sterilfiltrieren →auf Eis stellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde ausgehend von einer Übernachtskultur von DH5α-Bakterien frisches Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte OD<sub>595</sub> = 0,4 – 0,5 (Spektralphotometer U-2000) inkubiert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 4°C und 2.500 Upm abzentrifugiert (Multifuge 3L-R mit Rotor Ch. 2454). Das Bakterienpellet wurde in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens in eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Die so erhaltenen chemisch kompetenten Zellen wurden

entweder direkt in eine Transformation (s. II.2.5.3) eingesetzt oder als 200 µl-Aliquots bei -80°C weggefroren.

#### Elektrokompetente Zellen

Lösungen und Medium	Herstellung
LB-Medium	s. II.2.5.1
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert → auf Eis stellen

Ausgehend von einer 50 ml Übernachtskultur von DH10B-Bakterien wurden zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen 500 ml von frisch hergestelltem Medium zu einer Anfangs-OD<sub>595</sub> von 0,1 angeimpft und anschließend die Bakterien bei 30°C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,6 inkubiert (Inkubationsschüttler Unitron). Danach wurden 50 ml-Aliquots der Bakteriensuspension für 30 min auf Eis gestellt und durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 4.000 Upm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch. 2545) pelletiert. Die Pellets wurden in je 50 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert, erneut 15 min auf Eis gestellt und unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch weitere drei Male durchgeführt, wobei die Pellets zuerst in 20 ml, dann in 10 ml und schließlich in 1 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert wurden. Die so erhaltenen elektrokompetenten Zellen wurden in 100 µl-Aliquots aufgeteilt und entweder direkt in eine Elektroporation (s. II.2.5.3) eingesetzt oder als Glycerinkulturen bei -80°C gelagert.

### 2.5.3 Transformation von Bakterien

TSS-Protokoll (Chung et al., 1989; Hanahan et al., 1983)

Lösungen und Medium	Herstellung
LB-Medium	s. II.2.5.1
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Bacto-Agar ad 1.000 ml H <sub>2</sub> O →autoklavieren
Ampicillin	50 mg/ml →sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml →sterilfiltrieren

Für die chemische Transformation wurden 5-10 µl eines Ligationsansatzes (s. II.2.4.5) zu 200 µl kompetenten DH5α-Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C (Heizblock VLM LS 1) für 90 sek. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 1-2 min wurden

800 µl LB<sub>(0/Amp/Kan)</sub> zugegeben. Zur Regenerierung wurden die Zellen 45 min bei 37°C und 250 Upm (Inkubationsschüttler Unitron) inkubiert. Schließlich wurden unterschiedliche Volumina der Bakteriensuspension (z. B. 30, 300 und 600 µl) auf Agar-Platten mit den entsprechenden Selektions-Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Elektroporation

Lösungen und Medium	Herstellung
LB-Medium	s. II.2.5.1
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Bacto-Agar ad 1.000 ml H <sub>2</sub> O →autoklavieren
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	→autoklaviert
Ampicillin	50 mg/ml →sterilfiltrieren
Kanamycin	25 mg/ml →sterilfiltrieren

Für eine Transformation mittels Elektroporation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes (s. II.2.4.5) gegen H<sub>2</sub>O bei RT dialysiert (Membranfilter von Millipore, Porengröße:0,025 µm). Von der dialysierten DNA wurden ca. 5 µl zu 100 µl elektrokompetenten DH10B-Zellen gegeben und in auf Eis vorgekühlte 0,1 cm-Küvetten (BioRad) luftblasenfrei überführt. Die Elektroporation wurde bei RT und 2.500 V [Kapazität wird durch das Gerät (Electroporator 2510) festgelegt] durchgeführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml Medium vermischt und zur Regenerierung 60 min bei 37°C und 250 Upm (Inkubationsschüttler Unitron) inkubiert. Danach wurden davon unterschiedliche Volumina (z. B. 30, 300 und 600 µl) auf Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **2.6 Arbeiten mit immortalisierten Zelllinien**

### **2.6.1 Kultivierung und Passagieren**

Im Zuge dieser Arbeit wurden ausschließlich immortalisierte, d. h. unsterbliche Zelllinien aus diversen Nierengeweben (s. II.1.6.2) verwendet und keine Primärkulturen direkt aus Gewebe gewonnen. Es handelte sich dabei jeweils um adhärent wachsende Zellen, die im entsprechenden Zellkulturmedium (unten aufgeführt) in diversen Zellkulturflaschen oder -schalen in 37°C temperierten und 5% CO<sub>2</sub>-begasten Inkubatoren (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB) kultiviert wurden. Die Arbeiten an und mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an Zellkulturarbeitsbänken

(Heraeus Lamin Air HA 2448 GS) durchgeführt, wobei sämtliche Materialien und Geräte vor Gebrauch autoklaviert, mit 70%igem Ethanol behandelt und gegebenenfalls abgeflammt wurden.

Zellen	Kulturmedium	Zusätze
COS-7	DMEM high Glucose (4,5 g/L)	10% FCS
HEK-293T	DMEM high Glucose (4,5 g/L)	10% FCS
LLC-PK <sub>1</sub>	DMEM high Glucose (4,5 g/L)	10% FCS
LtTA-2,22	DMEM high Glucose (4,5 g/L)	10% FCS 200 µg/ml G-418
LtTA-2,22 mit stabil transfizierter Plasmid-DNA	DMEM high Glucose (4,5 g/L)	10% FCS 200 µg/ml G-418 500 ng/ml Puromycin

→Die jeweiligen Zusätze wurden in sterilfiltrierten Stammlösungs aliquots bei -20°C gelagert.

#### Auftauen von Zellen

Um eine Kultur einer Zelllinie anlegen zu können, wurden Zellen aus der tiefgefrorenen Zellbank bei -196°C entnommen, rasch aufgetaut und in ein 15 ml-Reagiergefäß mit vorgelegtem frischem Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 800 Upm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch. 2545) abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml frischem Kulturmedium mit entsprechenden Zusätzen resuspendiert. Die Suspension wurde dann in eine 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche überführt, welche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurde.

#### Kultivieren und Passagieren von Zellen

Um die Zelllinien über einen längeren Zeitraum in Kultur halten zu können, wurden diese nach Erreichen einer entsprechenden Zelldichte ‚gesplittet‘. Dieses ‚Passagieren‘ von Zellen bezeichnet das Ablösen von adhärent wachsenden Zellen vom Kulturflaschen- bzw. Kulturschalenboden und das anschließende Aussäen gewünschter Zelldichten in neue Kulturgefäße.

Lösungen und Medien	
10x PBS	1,4 M NaCl / 100 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 7,5 titrieren
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS
Trypsin-EDTA	1x
DMEM-Medium mit entspr. Zusätzen	siehe oben aufgeführt

Nach Erreichen der je nach Versuchsaufbau geforderten Zelldichte wurde das Kulturmedium aus dem Kulturgefäß abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Dies sollte nicht länger als 10 min dauern, da dann eine zellschädigende Wirkung des Trypsins eintreten kann. Die Zellen wurden gegebenenfalls durch leichtes Klopfen gegen den Boden des Kulturgefäßes abgelöst, um sie dann mit mindestens dem dreifachen Volumen an FCS-haltigen Medium abspülen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzeln zu können. In neuen Kulturgefäßen wurde frisches Kulturmedium mit den entsprechenden Zusätzen vorgelegt und jeweils ein Aliquot der trypsinisierten Zellsuspension zugegeben. Das Volumen richtete sich nach der gewünschten Konfluenz, gemessen in Prozent bezogen auf die Fläche des Kulturgefäßes. Um Zellen in einer definierten Dichte auszusäen, wurde die Zellzahl der abgelösten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zelldichte durch Zugabe von frischem Medium eingestellt.

#### Einfrieren von Zellen

Wurden die Zellen nicht mehr in Kultur benötigt, wurden sie zur Konservierung in tiefgefrorenen Zellbanken in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Dazu wurden die adhärenenten Zellen – wie oben beschrieben – trypsinisiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer 90% FBS/10% DMSO-Lösung resuspendiert (3 ml pro 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) zügig in Kryoröhrchen überführt und zunächst bei -80°C weggefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden sie nach 1-2 Wochen in die Zellbank im Flüssigstickstofftank gegeben.

### 2.6.2 Plasmid-DNA Transfektion von Zellen

Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion von Säugerzellen kann man die transiente und die stabile Transfektion unterscheiden. Soll ein Protein nur zeitweilig in den jeweiligen Zellen produziert werden, wird die transfizierte DNA bei der transienten Transfektion nicht stabil in das zelluläre Genom integriert. Bei der stabilen Transfektionsform hingegen kann durch geeignete Wahl von Selektionsmarkern dafür gesorgt werden, dass Zellen die gewünschte DNA dauerhaft in ihr Genom einbauen. Dadurch wird der Abbau von Fremd-DNA in der Wirtszelle verhindert.

#### Transiente Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Im Zuge dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) gearbeitet. Diese Transfektionsform beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Dabei wird die Fremd-DNA in Liposomen eingebaut, die leicht von den Zielzellen aufgenommen werden können. Die in den Reagenzien enthaltenen Lipide komplexieren aufgrund ihrer positiven Ladung sehr effektiv mit der negativ geladenen Plasmid-DNA. Diese Komplexe fusionieren mit der Zell-

membran und bringen somit die DNA in das Zellinnere. Anschließend findet die Expression der eingeschleusten Plasmide statt.

### Lösungen und Medien

Serumfreies DMEM-Medium	ohne Zusätze
Lipofectamine™ 2000	von Invitrogen bezogen
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
Trypsin-EDTA	1x

Für die transiente Transfektion wurde am Vortag die jeweilige Zelllinie in das für den Versuchsansatz benötigte Kulturgefäß (z. B. 6-well-Platte) gesplittet, so dass die Zellen am Folgetag eine Konfluenz zwischen 50-60% erreichten. Vor Beginn der Transfektion wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und diese zweimal mit reinem serumfreiem Medium gewaschen, anschließend 1 ml serumfreies Medium zugegeben und die Zellen während der Vorbereitung der Transfektionsreagenzien unter den bisherigen Bedingungen weiter inkubiert. Für die Transfektion wurde 1 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 250 µl serumfreien Medium vorbereitet. Parallel dazu wurden 2 µl des Transfektionsreagenzes Lipofectamine™ 2000 in 248 µl serumfreies Medium gegeben. Bei einem mehrfachen Transfektionsansatz konnte diese Lösung auch in den jeweilig multiplizierten Volumina zusammenpipettiert werden. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurde die vorbereitete Transfektionslösung vorsichtig mit der DNA-Lösung vermischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die komplexierte Lipofectamine™ 2000-DNA-Lösung zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken mit dem bereits vorgelegten serumfreien Medium vermengt. Für die Aufnahme der Fremd-DNA wurden die Zellen 4 – 5 h unter den üblichen Bedingungen inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Zur transienten Proteinexpression wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium für drei Tage unter den gewöhnlichen Zellkulturbedingungen (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB) kultiviert.

#### Transiente Transfektion mit DEAE-Dextran

Für die transiente Transfektion von COS-7 Zellen wurde die DEAE-Dextran-Methode (McCutchan and Pagano, 1968) angewendet, wobei die Zellen im Prinzip mit DEAE-Dextran und der Nukleinsäure gemischt werden. Als Polykation beeinflusst DEAE-Dextran die Endozytose durch eine Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen DNA und Strukturen auf der Zelloberfläche. Eine Chloroquin-Behandlung der Zellen soll die Transfektionseffizienz erhöhen.



Lösungen und Medien	
DMEM high Glucose (4,5 g/L)	10% FCS
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
DEAE-Dextran-Chloroquin-Lösung	10 mg/ml DEAE-Dextran 2,5 mM Chloroquin Diphosphat in 1x PBS →sterilfiltriert
DMSO	10% in 1x PBS

Hierfür wurden die Zellen ebenfalls am Vortag in geeignete Zellkulturgefäße (z. B. 6-well-Platte, P6-Petrischale) ausgesät, so dass sie am Folgetag eine Konfluenz zwischen 60-70% erreichten (Erfahrungswerte:  $\sim 2,1 \times 10^5$  Zellen / 6-well-Platte,  $\sim 4,5 \times 10^5$  Zellen / P6-Petrischale). Vor der Transfektion wird das Zellkulturmedium mit der DEAE-Dextran-Chloroquin-Lösung vermengt (40:1; z. B. 5 ml Medium + 200  $\mu$ l DEAE-Dextran-Chloroquin-Lösung) und im Anschluss 4  $\mu$ g/ml DNA zugegeben und gut vermischt. Nach Abnahme des Zellkulturmediums wird das DEAE-Chloroquin-DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben und 4 h bei 37°C (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB) inkubiert. Zum Stoppen wird das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen 2 min bei RT mit 10% DMSO in 1x PBS überschichtet. Es folgte ein Waschschrift mit 1x PBS, wonach zur Proteinexpression weitere zwei Tage unter gewöhnlichen Bedingungen (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB) im entsprechendem Medium (s. II.2.6.1) kultiviert wurde.

#### Stabile Transfektion

Für den dauerhaften Einbau von Fremd-DNA in ein Genom von Wirtszellen bediente man sich des Transfektionsreagenzes Poly-L-Ornithin (Dong et al., 1993). Als Wirtszellen wurden sog. LtTA-2,22-Zellen kultiviert (s. II.1.6.2), welche bereits mittels G-418 (Geneticin) auf das tTA-kodierende Plasmid selektioniert wurden (s. II.1.6.2). Es erfolgte eine Kotransfektion von LtTA-2,22-Zellen, wobei der das Puromycin-Resistenzgen enthaltende pWE3-Vektor und das pUHD10-3-Plasmid, auf welchem sich das entsprechende PKD2-Konstrukt (s. II.1.5.1) unter Kontrolle eines tTA-abhängigen CMV-Promotors befindet, verwendet wurden.

Lösungen und Medien	Zusätze
DMEM high Glucose (4,5 g/L) (Kulturmedium)	10% FCS 200 µg/ml G-418 25 ng/ml Doxyzyklin
DMEM high Glucose (4,5 g/L) (Selektionsmedium)	10% FCS 200 µg/ml G-418 25 ng/ml Doxyzyklin 500 ng/ml Puromycin
Poly-L-Ornithin	10 mg/ml in autoklaviertem H <sub>2</sub> O
DMSO	>99%; von Sigma bezogen
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
Trypsin-EDTA	1x

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in ein 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturgefäß ausgesät, so dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70% zu erreicht wurde. Da es sich hierbei, wie oben beschrieben, um eine Kotransfektion handelte, wurden zunächst die zu transfizierenden Plasmide vorbereitet. Zu 8 µg des Ziel-Protein-kodierenden Vektors pUHD10-3 wurden 0,8 µg des Puromycin-Selektionsplasmids pWE3 gegeben. Anschließend wurden 3 ml des jeweiligen Kulturmediums mit 3 µl Poly-L-Ornithin und der vorbereiteten Plasmid-DNA zügig vermischt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde diese Transfektionslösung auf die Zellen gegeben und 6 h unter gewöhnlichen Bedingungen inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium abgenommen und 4 ml einer Mischung aus 70% Kulturmedium und 30% DMSO für  $\leq 4$  min bei RT auf die Zellen gegeben. Nach Absaugen der Mischung wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen über Nacht in frischem Kulturmedium inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 1-2 ml Trypsin abgelöst und mit Kulturmedium auf 14 ml aufgefüllt. Hiervon wurden 1, 3 und 10 ml auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät und weiterkultiviert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen unter Selektionsdruck gesetzt, indem dem Kulturmedium der Selektionsmarker Puromycin zugesetzt wurde. Dieses Selektionsmedium wurde alle 2 Tage abgesaugt und durch frisches ersetzt, um nicht resistente, abgestorbene und abgelöste Zellen zu entfernen. Nach einer Zeitspanne von ungefähr 10 bis 14 Tagen hatten sich auf diese Weise Kolonien puromycinresistenter Zellen gebildet. Jede einzelne Kolonie wurde mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze abgeschabt, gleichzeitig aufgesaugt und in eine 24-Loch-Gewebekulturplatte überführt. Dort wurden die Zellen in Selektionsmedium so lange kultiviert, bis sie genügend dicht gewachsen waren, um sie durch Trypsinierung (s. II.2.6.1) in eine 6 cm-Kulturschale umzusetzen. Dabei verblieb jeweils ein kleiner Rest als Vorratskontrolle in der Gewebekulturplatte.

### 2.6.3 Induktion der Proteinproduktion bei stabil transfizierten Zellen

Bei den stabil transfizierten LtTA-2,22-Zellen wurde das sog. Tet-off-System (Gossen and Bujard, 1992) verwendet, welches auf dem Tetrazyklin-Resistenzoperon von *Escherichia coli* basiert. Bei diesem Tetrazyklin-regulierbaren System (Tet-System) kann die Proteinproduktion durch Zugabe von Tetrazyklin oder dessen Derivaten unterbunden werden (im Rahmen dieser Arbeit wurde Doxyzyklin verwendet, s. II.1.6.2)

Lösungen und Medien	Zusätze	
	induziert	nicht induziert
DMEM high Glucose (4,5 g/L) (Selektionsmedium)	10% FCS 200 µg/ml G-418  500 ng/ml Puromycin	10% FCS 200 µg/ml G-418 25 ng/ml Doxyzyklin 500 ng/ml Puromycin
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)	

Die puromycinresistenten LtTA-2,22-Klone wurden nach zwei Tagen in der 6 cm-Zellkulturschale zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Selektionsmedium ohne Doxyzyklin kultiviert, um die Expression der transfizierten PKD2-cDNA zu induzieren. Parallel wurden aber stets zeitgleich Zellen mit Doxyzyklin-haltigem Selektionsmedium als Negativkontrolle kultiviert.

### 2.6.4 Herstellen von Ganzzell-Lysat zur Proteinextraktion

Um die puromycinresistenten LtTA-2,22-Klone auf ihre jeweilige Proteinexpression zu testen, wurden die Zellen für eine anschließende Westernblot-Detektierung (s. II.3.3) lysiert. Hierfür wurden alle Arbeitsschritte auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt.

verwendete Lösungen	
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
PBS-Lyse-Puffer	1% Triton X-100 in 1x PBS

Die subkonfluenten Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml 1x PBS und mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4.000 Upm (Biofuge Pico mit Rotor Sorvall 3328) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100-250 µl PBS-Lyse-Puffer resuspendiert (Volumen abhängig von Zellpellet). Zum Lysieren der Zellen wurden diese 15-30 min auf Eis im Lyse-Puffer inkubiert und anschließend 15 min bei 14.000 Upm und 4°C abzentrifugiert (Sigma 3K20 mit Rotor Nr.

12154). Der Überstand mit dem freigesetzten Protein wurde abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Proteinextrakte, die nicht direkt im Anschluss weiter verarbeitet wurden (s. II.3), konnten bei -80°C gelagert werden.

### 2.6.5 Immunzytochemie

Zur Bestimmung der Lokalisation der exprimierten Proteine in den kultivierten, ggf. transfizierten Zellen wurden diese mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht.

#### verwendete Lösungen

1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
PFA-Lösung (pH 7,4)	4 g PFA in 80 ml H <sub>2</sub> O und 1-2 Tropfen NaOH unter Rühren und Erhitzen lösen. Anschließend 10 ml 10x PBS zugeben und abkühlen lassen. Mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen und mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen → Lagerung bei -20°C
Blockierungs- und Permeabilisierungslösung	1x PBS 2% BSA 0,1% Triton X-100
Lösung zum Verdünnen der Antikörper	1x PBS 2% BSA
Hochsalz-Waschlösung	1x PBS 350 mM NaCl
Hoechst 33258-Lösung	50 mg Bisbenzimid in 10 ml H <sub>2</sub> O → Lagerung bei 4°C im Dunkeln → vor Gebrauch 1:500 in H <sub>2</sub> O
Eindeckmedium	1x PBS 40% Glyzerin → vor Gebrauch sterilfiltrieren

Für immunzytochemische Versuche wurden die entsprechenden Zellen je nach Versuchsaufbau entweder auf Deckgläschen oder in sog.  $\mu$ -Dishes (35 mm, ibidi GmbH, München) ausgesät. Für die in dieser Arbeit relevante Fragestellung mussten die Zellen nahezu 100% konfluent gewachsen sein, bevor sie für die Antikörperfärbung auf dem entsprechenden Zellkulturboden zu fixiert wurden. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen 20-30 min in 4% PFA-Lösung bei RT inkubiert. Anschließend folgten drei 5-minütige Waschschrte in 1x PBS. Für die Blockierung von freien Bindungsstellen und zur Permeabilisierung der Zellen erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT (ggf. über Nacht bei 4°C) in der Blockierungs- und Permeabilisierungslösung. Nach einem erneuten Waschschrte in 1x PBS für 5 min wurde die Primärantikörper-Lösung zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde mittels mehrfachen Waschschrten (4 x 5 min) in Hochsalz-PBS entfernt. Nach einem erneuten 5-minütigen Waschschrte in 1x PBS wurden die Zellen 1-2 h bei RT im Dunkeln in der verdünnten Sekundärantikörper-Lösung

inkubiert. Anschließend wurde erneut viermal für je 5 min mit Hochsalz-PBS und einmal 5 min in 1x PBS gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurde für 1 min die verdünnte Hoechst 33258-Lösung zugegeben und danach die Zellen dreimal in 1x PBS gewaschen. Schließlich konnten die Zellen mit dem Eindeckmedium zur Lagerung und mikroskopischen Auswertung eingebettet werden. Zellen auf Deckgläschen wurden auf Objektträger transferiert und Zellen in den  $\mu$ -Dishes wurden mit entsprechenden Deckgläschen abgedeckt. Die Analyse und Bilddokumentation erfolgte an diversen (z. T. konfokalen) Fluoreszenzmikroskopen (Axiovert200; LSM710; beide: Zeiss, Oberkochen).

### 2.6.6 *In-vivo*-Färbung mittels FIAsh

Um das für die Immunzytochemie notwendige Fixieren der Zellen zu umgehen und die Zielproteine in lebenden Zellen anzufärben, wurde eine Tetracystein-basierte Protein-Detektionsmethode durchgeführt (näheres dazu s. II.9.3). Dabei wurden sowohl ein kommerziell erhältlicher (Invitrogen), als auch ein eigens hergestellter Fluorophor (Gruppe von Herrn Prof. B. König, Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg) namens FIAsh (Fluorescein Arsenical Hairpin Binder) verwendet und getestet. Ein wesentlicher Vorteil des FIAsh-Fluorophors ist, dass dieser aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft durch Zellmembranen diffundieren kann. So können intrazelluläre Zielproteine durch einfaches Inkubieren mit FIAsh spezifisch markiert werden, wenn sie eine sog. Tetracystein-Bindesequenz enthalten (s. II.9.1). Unspezifisch gebundenes FIAsh kann zu einer störenden Hintergrundmarkierung führen. Aus diesem Grund wurde es zusammen mit ungebundenem FIAsh durch Zugabe von Dithiol gebunden und entfernt. Bei dieser Methode bedurfte es einer Optimierung für das jeweilig angewandte System.

#### verwendete Lösungen

Zellkulturmedium (s. II.2.6.1)	ohne Phenolrot
DMSO	von Sigma Aldrich bezogen
„FIAsh-EDT <sub>2</sub> -Färbereagenz“	2 mM FIAsh-EDT <sub>2</sub> in DMSO → fertig von Invitrogen bezogen
„FIAsh-EDT <sub>2</sub> -Färbereagenz“	0,5 mM FIAsh-EDT <sub>2</sub> in DMSO → Lehrstuhl für Organische Chemie; Prof. B. König
EDT-Lösung	25 mM 1,2-Ethandithiol in DMSO
→ FIAsh-EDT <sub>2</sub> Färbereagenz + EDT-Komplex-Lösung	1 + 1 Volumenanteile mischen → 1 mM FIAsh-EDT <sub>2</sub> → 12,5 mM EDT → 5-10 min bei RT
„BAL“-Waschpuffer	250 mM 2,3-Dimercaptoethanol in DMSO → auf 37°C vorwärmen

Für die Lebend-Zell-Färbung wurden die entsprechenden Zellen in sog.  $\mu$ -Dishes (35 mm; ibidi GmbH, München) kultiviert und für die für diese Arbeit relevante Fragestellung bis zu einer nahezu 100%igen Dichte herangezogen. Für die *in-vivo*-Färbung wurden die EDT-Lösung, das ‚FIAsH-Färbereagenz‘ und die aus den beiden Komponenten bestehende FIAsH-EDT<sub>2</sub>-komplexbildende Lösung vorbereitet. Anschließend wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und diese zweimal in dem entsprechenden Zellkulturmedium ohne Phenolrot gewaschen, da dieser Farbstoff eine Eigenfluoreszenz besitzt, die die spezifische Fluoreszenz stören würde. Die Zellen wurden daraufhin mit 300  $\mu$ l des farbstofflosen Mediums überschichtet. Hiervon wurden 30  $\mu$ l abgenommen, mit der vorbereiteten FIAsH-EDT<sub>2</sub>-Komplex-Lösung vermischt und die Zellen weitere 10 – 15 min bei RT inkubiert, bevor das FIAsH-Gemisch auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt wurde. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C (Zellkultur-Brutschrank APT.line™ CB). Anschließend wurde das FIAsH-enthaltende Medium abgenommen und die Zellen 10 min (mindestens 8 min) bei 37°C in dem ‚BAL-Waschpuffer‘ inkubiert. Dieser Waschschrift wurde zwei- bis dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in farbstofflosen Zellkulturmedium gewaschen und für die Lebend-Zell-Mikroskopie (Axiovert200-Mikroskop; LSM 710 in Verbindung mit dem inversen Mikroskop Axio Observer; beide: Zeiss, Oberkochen) überschichtet.

### 3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Sämtliche kolorimetrische Proteinbestimmungen wurden entsprechend der Methode nach Bradford (1976) mit BSA-Stammlösungen von 0,1 – 5  $\mu$ g/ $\mu$ l vorgenommen. Die photometrischen Messungen der Extinktionen bei 590 nm und 450 nm erfolgten an einem Spektralphotometer („U-2000“). Das Prinzip beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 mit Proteinen einen Komplex bildet, welcher eine photometrisch quantifizierbare Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zur Folge hat. Da diese Verschiebung über weite Bereiche direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, kann folglich aus den Extinktionswerten über eine Eichgerade die Konzentration bestimmt werden.

#### verwendete Lösungen

BSA-Eichlösungen	BSA in folgenden Konzentrationen: 0 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1,5 und 5 $\mu$ g/ $\mu$ l
Roti®-Quant	1:5 Verdünnung des Konzentrats
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

Für die Erstellung der Eichkurve wurden zunächst je 10 µl der BSA-Eichlösungen zu je 1 ml der verdünnten Roti®Quant-Lösung gegeben und in Plastikkuvetten vermengt. Anschließend wurden je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung in Plastikkuvetten mit 1 ml der verdünnten Roti®Quant-Lösung gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden sowohl die Extinktionen der Standard- als auch der Lysatproben an einem Spektralphotometer („U-2000“) bei 450 nm und 590 nm gegen H<sub>2</sub>O gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde zunächst bei allen Proben der Quotient aus OD<sub>590</sub> und OD<sub>450</sub> berechnet und davon jeweils der Quotient der Negativkontrolle (0 µg BSA) abgezogen. Durch den erhaltenen korrigierten Quotienten wurden die eingesetzten BSA-Mengen dividiert und aus den resultierenden Werten der Mittelwert gebildet. Damit wurden die korrigierten Quotienten der Lysatproben multipliziert. Schließlich wurden Verdünnungsfaktor und eingesetztes Volumen berücksichtigt und die Proteinkonzentration in µg/µl berechnet.

## 3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 3.2.1 Herstellung der Gele

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden diskontinuierliche denaturierende SDS-Polyacrylamidgele mit 10%igen Trenngelen verwendet (Laemmli, 1970; modifiziert nach Schägger und von Jagow, 1987). Nach etwa 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde ein 4%iges Sammelgel überschichtet und ein entsprechender Gel-Kamm eingesetzt.

Stammlösungen	
Trenngel-Puffer (4x Lower Tris)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% SDS
Sammelgel-Puffer (4x Upper Tris)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% SDS

Für ein Gel der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm wurden folgende Volumina benötigt:

Lösungen	10% Trenngel	4% Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	9,3 ml	1,3 ml
Trenn- / Sammelgel-Puffer	7,0 ml	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	11,6 ml	6,1 ml
TEMED	16 µl	10 µl
10% APS (w/v in H <sub>2</sub> O)	78 µl	50 µl

### 3.2.2 Probenvorbereitung

#### Lösungen

5 x SDS-Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,7 50% Glyzerin 12,5% SDS 12,5% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau →pH 7,5 mit 1 N HCl einstellen
----------------------	---

Alle Proben wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit einem entsprechenden Volumen des 5x Probenpuffers (Endkonz. 1x) versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Pro Probe wurde das entsprechend ermittelte Volumen für eine Proteinmenge von 30 µg auf das Gel aufgetragen.

### 3.2.3 Elektrophoresebedingungen

#### Lösungen

10 x Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1% SDS
-----------------	---------------------------------------

Die Elektrophorese für die Gelgröße 14 cm x 12 cm x 1,5 mm erfolgte bei 500 V (oder 10 V über Nacht im Kühlraum) (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System ,SE 600 Series für Electrophoresis Unit', Hoefer). Für die kleineren Gele der Größe 8 cm x 4 cm x 1 mm waren 120 V (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System oder Mini Protean® II Electrophoresis Cell, beides Bio-Rad) bei RT ausreichend.

## 3.3 Western-Blot

### 3.3.1 Elektroblot von Proteinen auf PVDF-Membran

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße, Immobilon-P Transfermembran). Vor Verwendung wurde diese etwa 1 min in Methanol geschwenkt und auf diese Weise benetzt. Anschließend wurden sowohl Membran und Gel als auch die erforderlichen Whatman Papierstücke (6 Stücke, zugeschnitten auf Gelgröße, Biometra, Göttingen) und die ebenfalls benötigten Schaumstoffpolster für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das Tank-Blot-System angewendet. Die getränkten Blotbestandteile wurden in einem Träger der Blotvorrichtung luftblasenfrei zu einem Stapel zusam-



mengesetzt. Auf die später der Anode zugewandten Seite des Trägers (grau) wurde zunächst ein Schaumstoffpolster gelegt, worauf drei Lagen des Whatman-Papiers geschichtet wurden. Es folgte die PVDF-Membran, auf welche vorsichtig das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel transferiert wurde. Anschließend wurden weitere drei Lagen des Whatman-Papiers aufgelegt und mit einem zweiten Schaumstoffpolster abgedeckt. Der verschlossene Träger wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer (Western-Transferkammer „TE 62) gestellt.

#### verwendete Lösungen

<b>Transferpuffer</b>	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,01% SDS
-----------------------	--

Der Proteintransfer erfolgte unter ständiger Kühlung (10°C) und stetem Umwälzen des Transferpuffers mittels eines Magnetrührstabes bei 1 A für 3 – 4 h.

### 3.3.2 Immunologischer Nachweis

Nach dem Elektrotransfer konnten die Proteine auf der PVDF-Membran mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen und identifiziert werden. Alle Inkubationsschritte des immunologischen Nachweises wurden unter Schütteln bei RT durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Membran zu keinem Zeitpunkt antrocknete.

#### verwendete Lösungen

1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
Blocklösung	1x PBS 5% Magermilchpulver (MM) 0,5% Tween 20
Lösung zum Verdünnen der Antikörper	1x PBS 3% Magermilchpulver (MM) 0,5% Tween 20
Waschlösung	1x PBS 0,5% Tween 20

Die Membran wurde zunächst für 5-10 min in PBS/Tween-Puffer geschwenkt und anschließend zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in einer PBS/Tween-Lösung inkl. 5% Magermilchpulver (MM) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 5 min in PBS/Tween-Puffer gewaschen, bevor eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper, gelöst in PBS/Tween-Puffer inkl. 3% MM erfolgte. Danach wurde die Membran zur Entfernung von ungebundenen Primärantikörpern zweimal für je 5 min in PBS/Tween-Puffer und weitere zweimal für je 5 min in

PBS/Tween inkl. MM gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem in PBS/Tween-Puffer inkl. 3% MM verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1-2 h. Durch eine anschließende mehrstufige Waschprozedur wurde ungebundener sekundärer Antikörper entfernt (4 x 5 min in PBS/Tween; 2 x 5 min in 1x PBS).

Die immunologische Detektion der Proteine erfolgte durch eine einminütige Inkubation der Membran in einem adäquaten Volumen der vorbereiteten Lösung des Western Lightning Chemo-luminescence Reagent von Perkin Elmer. Dazu wurden kurz zuvor das Luminol- und das Oxidations-Reagenz im Verhältnis 1:1 gemischt. Die gut abgetropfte Membran wurde anschließend luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie in einer Filmkassette überführt. Alle weiteren Schritte des Auflegens und Entwickeln des Röntgenfilmes wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt. Die Expositionsdauer des Filmes war dabei abhängig von dem jeweils verwendeten Primärantikörper, der eingesetzten Proteinmenge und der Bandenintensität. Zur Entwicklung des Röntgenfilmes wurde dieser unter Beobachtung solange in der Eurobrom-Entwickler-Lösung inkubiert, bis die gewünschte Intensität der Proteinbande erreicht war. Nach einem kurzen Waschschrift in Wasser wurden die Proteinbanden 10 – 15 min in Acido Fixierlösung fixiert. Auf dem luftgetrockneten Röntgenfilm konnte durch Übereinanderlegen mit der entsprechenden PVDF-Membran das Proteinmarker-Bandenmuster übertragen werden und somit die jeweiligen Proteinbanden identifiziert werden.

## **4 Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden**

Für routinemäßige elektronenmikroskopische Untersuchungen von biologischen Proben bei Raumtemperatur müssen diese so weit wie möglich vakuumstabil, trocken und strahlunempfindlich sein. Dazu müssen sie eine Reihe von Präparationsmethoden durchlaufen, wobei es von der wissenschaftlichen Fragestellung abhängig ist, welche Methode verwendet wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden je nach Versuchsaufbau zwei grundsätzlich verschiedene Fixierungsmethoden angewendet, welche wiederum eine unterschiedliche Prozedur der Probenpräparation nach sich zogen. Dies soll in folgendem Schema kurz dargestellt werden:



Schematische Darstellung chemischer und physikalischer Präparationsverfahren. Die wesentlichen Schritte dabei sind die Fixierung und die Kontrastierung, die Entwässerung bzw. die Substitution und die Einbettung der biologischen Probe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden epitheliale Zelllinien aus dem proximalen Nierentubulus vom Schwein für elektronenmikroskopische Untersuchungen in Zellkultur gehalten. Dabei handelte es sich hauptsächlich um die nicht-transfizierte Zelllinie LLC-PK<sub>1</sub> und um LtTA-2,22-Zellen, welche

entweder transient oder stabil mit einem entsprechenden Plasmid-DNA-Konstrukt transfiziert wurden.

#### 4.1 Konventionelle Präparation der Zellen

Die chemische Fixierung ist die klassische Methode und wird häufig routinemäßig eingesetzt. Hierbei werden biologische Proben mit Aldehyden fixiert, anschließend mit Schwermetallen kontrastiert, mit organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur entwässert und schließlich in ein Kunstharz eingebettet.

##### 4.1.1 Zellkultur

Für die konventionelle Präparation wurden die je nach Versuchsaufbau verwendeten Zellen (s. II.1.6.2) in sog.  $\mu$ -Dishes (35 mm, ibidi GmbH, München) in Zellkultur (s. II.2.6) gezogen. Diese  $\mu$ -Dishes besitzen einen Boden mit höchster optischer Qualität für die inverse Mikroskopie. Die Bodenstärke entspricht der eines Deckglases (180  $\mu$ m; No. 1,5). Dabei gibt es auch  $\mu$ -Dishes Grid-500 mit einem im Boden eingepprägtem Gitter, welches die Zellwiederfindung zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht.

Für die in dieser Arbeit relevanten Fragestellungen mussten die Zellen für die elektronenmikroskopische Präparation nahezu zu 100% konfluent gewachsen sein.

##### 4.1.2 Chemische Fixierung

Formaldehyd ist ein proteinvernetzendes Fixativ, welches wenig denaturierend wirkt und größtenteils die Sekundärstruktur der Proteine erhält, sodass auch teilweise Enzymaktivitäten und Antigenstrukturen erhalten bleiben. Es diffundiert schneller als z. B. Glutaraldehyd in das biologische Material, die Reaktionen verlaufen allerdings im Vergleich mit Glutaraldehyd langsamer und sind zum Teil reversibel. Andererseits besitzt Formaldehyd die Fähigkeit, Lipide so zu fixieren, um deren Auswaschen zu verhindern (Hayat, 1970).

verwendete Lösungen	
4% PFA-Lösung (pH 7,4)	4 g PFA in 80 ml H <sub>2</sub> O und 1-2 Tropfen NaOH unter Rühren und Erhitzen lösen. Anschließend 10 ml 10x PBS zugeben und abkühlen lassen. Mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen und mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen → Lagerung bei -20°C
1x PBS	1:10 Verdünnung von 10x PBS (s. II.2.6.1)
2% GA-Lösung	2% Glutaraldehyd in 100 mM Kakodylat-Puffer
Kakodylat-Puffer	100 mM Kakodylsäure (Natriumsalz) in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Hatten die Zellen die gewünschte Dichte erreicht, wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die PFA-Lösung bzw. GA-Lösung zugegeben. Die Fixierung erfolgte 20-30 min bei RT oder alternativ auf Eis. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen.

#### 4.1.3 Nachfixierung und Kontrastierung

Zur Kontrastierung und Nachfixierung wurde Osmiumtetroxid und z. T. Uranylacetat verwendet. Unter der Wirkung von Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid wird das Zytoplasma in ein elektronentransparentes Gel überführt. Im Gewebe bilden sich zwischen den Molekülen durch Quervernetzung Brücken. Die Konzentration von Osmiumtetroxid muss so gewählt werden, dass Mikrofilamente und Zellen nicht zerstört werden. Sie darf nicht mehr als 1-2% betragen (Robinson et al., 1985). Eine 1%ige Osmiumtetroxid-Lösung braucht ca. 4 h für 1 mm Eindringtiefe (persönliche Mitteilung Prof. Rachel). Arbeiten mit Osmiumtetroxid wurden stets unter dem Abzug durchgeführt.

<b>verwendete Lösungen</b>	
Kakodylat-Puffer	100 mM Kakodylsäure (Natriumsalz) in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
2% OsO <sub>4</sub>	4%ige fertige OsO <sub>4</sub> -Lösung mit Kakodylat-Puffer 1:2 verdünnt
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	→autoklaviert in 50-100 ml Schottflaschen lagern
2% Uranylacetat	2 g Uranylacetat in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Da für die Nachfixierung Kakodylat-gepuffertes Osmiumtetroxid verwendet wurde, folgten nach der Fixierung noch zwei weitere 5-minütige Waschschrte in Kakodylat-Puffer. Anschließend wurden die Zellen in 2% Osmiumtetroxid auf Eis nachfixiert und kontrastiert. Nach zweimal 1-minütigem Waschen in Kakodylat-Puffer, wurde dies dreimal mit H<sub>2</sub>O wiederholt. Daraufhin folgte ein weiterer Kontrastierungsschritt mit 2%igem Uranylacetat, welches über Nacht (bei 4°C) auf die Zellen gegeben wurde. Die Proben wurden am Folgetag vor den Dehydratisierungsschritten erneut fünfmal für je 1 min in H<sub>2</sub>O gewaschen.

#### 4.1.4 Entwässerung

Vor der Infiltrierung und Einbettung in ein Kunstharz muss das zelluläre Wasser entfernt und durch geeignete Lösungsmittel ersetzt werden, da die Einbettmedien unlöslich in Wasser sind. Ethanol, Aceton und Methanol stellen die am häufigsten verwendeten Substitutionsmedien dar, wobei jedes für sich Vor- und Nachteile aufweist. Um den Lipidverlust und somit die Zerstörung des

biologischen Materials zusätzlich so gering wie möglich zu halten, wird der Entwässerungsvorgang möglichst bei tiefen Temperaturen durchgeführt (Stein, 1971).

<b>verwendete Lösungen</b>	
aufsteigende Ethanolreihe	20%, 50%, 70%, 90%, 100% in H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert in 50-100 ml Schottflaschen lagern
<u>bei weiterer Verwendung von Epon:</u>	
Ethanol-Aceton-Lösung	Gleiche Volumenanteile mischen (1 + 1)
Aceton	p. a. Qualität

Die Entwässerungsschritte wurden auf Eis durchgeführt und jede Ethanol-Lösung der Reihe nach für 2 min auf die Zellen gegeben und danach wieder abgenommen. Angefangen bei 20% EtOH über 50% EtOH folgten zwei Schritte in 70% EtOH und zwei Schritte in 90% EtOH. Die Entwässerungsprozedur endete mit drei Schritten in 100% EtOH, wobei die Zellen bei den letzten beiden Schritten vom Eis genommen und auf RT gestellt wurden. Vor der Infiltration und Einbettung in Epon musste Ethanol durch Aceton ausgetauscht werden, da ersteres mit Epon nicht mischbar ist. Dazu wurde zuerst für 5 min eine 1:1-Mischung von Ethanol und Aceton auf die Zellen gegeben und dann zweimal für je 5 min reines Aceton.

#### 4.1.5 Infiltrierung und Einbettung in Kunstharz

Als Einbettmedien wurden im Zuge dieser Arbeit hauptsächlich die Epoxid-Harze Epon® 812 und Durcupan verwendet, welches auf Araldite® basiert. Epoxid-Harze sind unter dem Elektronenstrahl stabil und ihre Polymerisation verläuft gleichmäßig; sie ist nur mit geringen Volumenschwankungen von bis zu 2% verbunden. Jedoch besitzen sie eine relativ hohe Viskosität, was eine vergleichbar lange Infiltrationszeit notwendig macht (Glauert, 1975).

Die entwässerten Proben wurden etappenweise mit dem Einbettmedium infiltriert. Um ein komplettes und kontinuierliches Eindringen des Harzes in die Proben zu gewährleisten, wurden die Proben mit Lösungen steigender Harz-Konzentrationen inkubiert.

<b>verwendete Lösungen für Epon-Einbettung</b> (Luft, 1961)	
Aceton	p. a. Qualität

Epoxy-Einbettungsmittel (1)	46% (v/v)
Härter DDSA (2)	28,55% (v/v)
Härter MNA (3)	25,3% (w/v)
Beschleuniger DMP-30 (4)	0,2% (w/v)

Zur Herstellung des Epon-Gemisches wurden zuerst die ersten drei Komponenten (Harz, DDSA und MNA) in den entsprechenden Mengen zusammen pipettiert und auf einem Magnetrührer 30 min durch langsames Rühren vermischt. Anschließend wurde der Beschleuniger (DMP-30) zugegeben und erneut 30 min langsam gerührt und vermischt. Dabei war darauf zu achten, dass sich wenige Luftblasen bildeten. Mit dem fertigen Epon-Mix wurden dann die für die Infiltration notwendigen Verdünnungen mit Aceton hergestellt und in der unten angegebenen Reihenfolge und Dauer auf die Zellen gegeben.

Lösung	Verhältnis Epon + Aceton	Dauer	Temperatur
Epon 25%	1 + 2	30 min	RT
Epon 50%	1 + 1	30 min	RT
Epon 75%	2 + 1	über Nacht	RT
Epon	Pur	2 h	30°C
Epon	Pur	>2 d	60°C

Vor der eigentlichen Polymerisation für 48 h bei 60°C wurden die Proben mit frischem Epon für 2 h bei 30°C inkubiert, um etwaige Luftblasen entweichen zu lassen.

verwendete Lösungen für Durcupan-Einbettung	
Ethanol	p. a. Qualität
Epoxy-Harz (A)	11 g
Härter 964 (B)	10 g
Beschleuniger 960 (DY 060) (C)	0,3 g
Weichmacher (D)	0,1 g

Zur Herstellung des Durcupan-Mix wurden zuerst die drei Komponenten Harz (A), Härter (B) und Weichmacher (D) in den entsprechenden Mengen zusammenpipettiert und auf einem Magnet-rührer 30 min durch langsames Rühren vermengt. Anschließend wurde der Beschleuniger (C) zugegeben und erneut 30 min langsam gerührt und vermischt. Dabei war darauf zu achten, dass sich wenige Luftblasen bildeten. Mit dem fertigen Durcupan-Mix wurden dann die für die Infiltration notwendigen Verdünnungen mit Ethanol hergestellt und in der unten angegebenen Reihenfolge und Dauer auf die Zellen gegeben.

<b>Lösung</b>	<b>Verhältnis Durcupan + Ethanol</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
Durcupan 50%	1 + 1	30 min	RT
Durcupan	pur	30 min	RT
Durcupan	pur	2 x 1 h	RT
Durcupan	pur	2 h	30°C
Durcupan	pur	>2 d	60°C

Vor der eigentlichen Polymerisation für 48 h bei 60°C wurden die Proben mit frischem Durcupan für 2 h bei 30°C inkubiert, um etwaige Luftblasen entweichen zu lassen.

## 4.2 Kryo-Präparation der Zellen

Die Kombination aus Kryofixierung, Gefriersubstitution mit chemischer Fixierung und anschließender Tieftemperatureinbettung umgeht die denaturierenden Effekte der konventionellen Präparationstechniken, wobei der Kryofixierung hinsichtlich der Stabilisierung zellulärer und extrazellulärer Komponenten eine zentrale Bedeutung zukommt (Bleck et al., 2010; Mühlfeld, 2010; Stierhof and El Kasmi, 2010; Humbel, 1983; Hunziker, 1984). Eine Fragestellung in dieser Arbeit war die Etablierung des Hochdruckgefrierens von renalen Tubulusepithelzellen mit dem Fokus auf das primäre Zilium. Im Anschluss an die Kryofixierung (II.4.2.3) erfolgte die Gefriersubstitution (II.4.2.4) und eine abschließende Einbettung in Epon oder Araldite (II.4.2.5) bei Raumtemperatur.

Die für die Kryo-Präparation verwendeten Geräte und Materialien wurden von Leica Microsystems GmbH (Wetzlar) bezogen.



### 4.2.1 Vorbereitung

#### Reinigung der Saphirplättchen

Um die Zelllinien auf den für die Hochdruckgefrierung vorgesehenen Saphirplättchen (Durchmesser 1,4 mm, Dicke 50 µm; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) aufwachsen lassen zu können, mussten diese im Vorfeld gesäubert und sterilisiert werden.

#### **verwendete Lösungen**

Essigsäure-Lösung	z. B. 5%; verdünnt aus konz. Essigsäure p. a.
Ethanol	70% EtOH in H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

Dazu wurden sie über Nacht in verdünnte Essigsäure in einer Glaspetrischale in den Abzug gelegt und am nächsten Tag mit H<sub>2</sub>O gründlich gespült. Anschließend wurden sie zur Sterilisation für mehrere Stunden in 70%igen Ethanol geschwenkt.

#### Beschichtung der Saphirplättchen

Je nach Fragestellung wurden die Saphirplättchen zum Aufwachsen der Zellen unterschiedlich vorbehandelt; d. h. mit unterschiedlichen Substanzen beschichtet.

#### **verwendete Lösungen und Materialien**

Kohle-Bedampfung	Edwards E 306 A; ca. 10 nm
Fibronectin (Becton Dickinson)	50 µg/ml Lösung in 1x PBS →sterilfiltriert
Poly-L-Lysin (Sigma)	0,1 mg/ml Lösung in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> →sterilfiltriert
Collagen I	50 µg/ml in 0,02 N Essigsäure Endkonz. 3,34 mg/ml in 1x PBS

### 4.2.2 Zellkultur

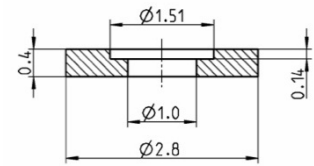
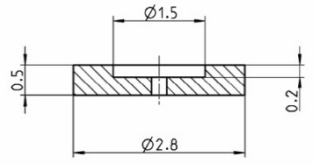
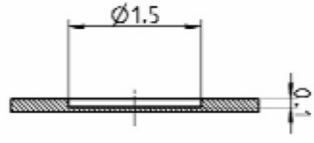

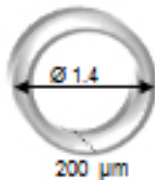
Zum Aufwachsen der, je nach Versuchsaufbau, verwendeten Zellen (s. II.1.6.2) wurden die Saphirplättchen in sterile Zellkulturschalen (Petrischalen oder ibidi-Dishes) gelegt. Daraufhin konnten die jeweiligen Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät (s. II.2.6.1) werden. Waren die Zellen nach einigen Tagen nahezu konfluent, wurde das Saphirplättchen vorsichtig in eine frische Zellkulturschale mit entsprechendem Zellkulturmedium transferiert. Dies erleichterte den späteren Transfer

der Plättchen zum Hochdruckgefrieren, da sie nicht so stark am Zellkulturboden anhaften und dadurch das Risiko des Ablösens der Zellen auf den kleinen Saphirplättchen verringert wird.

Für die in dieser Arbeit relevanten Fragestellungen mussten die Zellen für die elektronenmikroskopische Präparation nahezu zu 100% konfluent gewachsen sein.

#### 4.2.3 Hochdruckgefrieren

Bei dieser physikalischen Fixierung von biologischen Proben werden wasserhaltige Proben schnellstmöglich kryoimmobilisiert, sodass ihr aktueller Zustand möglichst naturnah eingefroren wird. Durch den hohen Druck (ca. 2100 bar) in Verbindung mit ultraschnellem Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) kommt es zu einer Vitrifizierung des zellulären Wassers, bei der zusätzlich die Bildung von Eiskristallen weitestgehend ausgeschlossen wird.

verwendete Träger	Dicke	
„Live cell“ Präparatträger; goldbeschichtet	400 µm	
Flachpräparathalter (FPH); goldbeschichtet	200 µm	
Membranpräparatträger (MPT); goldbeschichtet	100 µm	
Abstandshalter für FPH; Edelstahl (Physik-Werkstatt; Universität Regensburg)	150 µm	
Abstandshalter für MPT; Edelstahl (Physik-Werkstatt; Universität Regensburg)	50 µm	

Die Saphirplättchen wurden mit den adhärenenten und konfluent gewachsenen Zellen in die je nach Versuchsaufbau verwendeten Präparatträger (oben aufgeführt) vorsichtig, aber zügig transferiert. Dabei wurde zum einen darauf geachtet, dass die Zellen ständig mit Medium bedeckt sind, um nicht anzutrocknen, und dass das Saphirplättchen luftblasenfrei in dem Träger liegt, da ansonsten die thermische Leitfähigkeit nicht optimal gewährleistet werden kann. Zur Optimierung wurden

von der Physik-Werkstatt (Universität Regensburg) angefertigte Abstandshalter auf die Saphirplättchen gelegt, um diese stabiler in den Präparatträgern zu fixieren. Dieses ‚Sandwich‘ wurde dann in einem Bajonethalter eingespannt und mit Hilfe einer Bajonettladevorrichtung manuell in die Probenschleuse des Hochdruckgefrierers EM PACT2 eingebracht [alternativ: automatischer Proben-transfer mit Bajonettvorrichtung für EM RTS (Rapid Transfer System)]. Dort wurden die Proben bei einem Arbeitsdruck von etwa 2100 bar mit flüssigem Stickstoff innerhalb von 10 msek kryoimmobilisiert. Anhand der Verlaufskurven von Druck und Temperatur konnte der Gefriervorgang kontrolliert und protokolliert werden. Bis zur Weiterbearbeitung werden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert und transportiert. Eine Exposition bei einer Temperatur oberhalb von  $T \approx -140^\circ\text{C}$  sollte auf jeden Fall vermieden werden, da dies zu einer Rekristallisierung des vitrifizierten Wassers im biologischen Material führt und dadurch die kryofixierten Proben zerstört werden.

#### 4.2.4 Gefriersubstitution mit chemischer Fixierung

Das Prinzip der Gefriersubstitution beruht darauf, dass das vitrifizierte Wasser in den kryofixierten biologischen Proben durch ein organisches Lösungsmittel ersetzt wird. Dieses ist im Gegensatz zum Wasser mit dem späteren Einbettmaterial mischbar. Der Vorgang der Substitution geschieht bei sehr niedrigen Temperaturen, bei denen keine (Sekundär-)Eiskristallbildung stattfinden kann. Um eine Erhaltung der biologischen Strukturen auch bei RT zu gewährleisten, werden dem Dehydratisierungsmittel chemische Fixantien zugesetzt; im Falle von  $\text{OsO}_4$  wirkt dieses zusätzlich auch kontrastierend. Als weiteres Kontrastierungsmittel wurde Uranylacetat verwendet. Dieses wird für eine verbesserte Morphologie der Membranstrukturen durch Verringerung der Extraktion der Phospholipide in einer Vielzahl von Studien empfohlen (van Lookeren, 1991; Horowitz, 1990; Berryman, 1990; Humbel, 1989). Auch die Zugabe von geringen Mengen von Wasser zum Substitutionsmedium sorgt für eine bessere Strukturhaltung der Membranen (Buser und Walther, 2008; Walther und Ziegler, 2002).

Zur Gefriersubstitution der hochdruckgefrorenen Proben wurde die unten beschriebene Gefriersubstitutionslösung jeweils frisch hergestellt. Arbeiten mit  $\text{OsO}_4$  wurden immer unter dem Abzug durchgeführt.

#### Substitutionslösung

2% $\text{OsO}_4$	250 mg kristallines $\text{OsO}_4$
0,25% UAc	625 $\mu\text{l}$ 5% UAc in $\text{H}_2\text{O}$
5% $\text{H}_2\text{O}$	in 0,25% UAc enthalten
Aceton	11,875 $\mu\text{l}$ Aceton p.a.

Die fertige Substitutionslösung wurde in eine dafür vorgesehene Reagenzienwanne mit Durchflusstring-Einsatz pipettiert und in der automatischen Gefriersubstitutionsanlage EM AFS2 (Automatic Freeze Substitution System) auf  $T < -90^{\circ}\text{C}$  tiefgeköhlt. Anschließend wurden die kryofixierten Proben zügig mit der Probenseite nach oben auf das gefrorene Substitutionsmedium transferiert. Dadurch wurde ein langsames Einsinken der Flachpräparathalter ohne Probenverlust beim anschließenden ‚Erwärmen‘ – und demzufolge Auftauen – der Substitutionslösung gewährleistet. Das Programm für die Gefriersubstitution konnte individuell eingestellt und gespeichert werden.

#### Standardprogramm

Lösung	Dauer	Temperatur
Substitutionslösung	1,5 h	$-140^{\circ}\text{C} \rightarrow -90^{\circ}\text{C}$
	8 h – max. 36 h	$-90^{\circ}\text{C}$
	3 h	$-90^{\circ}\text{C} \rightarrow -60^{\circ}\text{C}$
	8 h	$-60^{\circ}\text{C}$
	3 h	$-60^{\circ}\text{C} \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$
	8 h	$-30^{\circ}\text{C}$
	3 h	$-30^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$
	6 h	$0^{\circ}\text{C}$

#### Verkürztes Programm

Lösung	Dauer	Temperatur
Substitutionslösung	1,5 h	$-140^{\circ}\text{C} \rightarrow -90^{\circ}\text{C}$
	6 h	$-90^{\circ}\text{C}$
	1 h	$-90^{\circ}\text{C} \rightarrow -60^{\circ}\text{C}$
	3 h	$-60^{\circ}\text{C}$
	1 h	$-60^{\circ}\text{C} \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$
	3 h	$-30^{\circ}\text{C}$
	1 h	$-30^{\circ}\text{C} \rightarrow 0^{\circ}\text{C}$
	3 h	$0^{\circ}\text{C}$

### 4.2.5 Infiltration und Einbettung in Epon

Für die Einbettung von kryofixierten Proben wurde im Gegensatz zur konventionellen Präparation (s. II.4.1.5) ausschließlich Epon® 812 als Einbettungsmittel verwendet.

verwendete Lösungen		
Epon-Mischung	Epoxy-Einbettungsmittel	46% (v/v)
	Härter DDSA	28,55% (v/v)
	Härter MNA	25,3% (w/v)
	Beschleuniger DMP-30	0,2% (w/v)
	→ Herstellung s. II.4.1.5	
Aceton	p. a. Qualität	

Mit dem fertigen Epon-Mix wurden dann die für die Infiltration notwendigen Verdünnungen mit Aceton hergestellt und in der unten angegebenen Reihenfolge und Dauer auf die Zellen gegeben. Zuvor wurde das Substitutionsmedium abgenommen und es folgten drei Waschschrte in Aceton. Die Proben konnten in der Reagenzienwanne und auch in der AFS-Anlage verbleiben, die den weiteren Temperatur- und Zeitverlauf automatisch regelt.

Lösung	Verhältnis Epon + Aceton	Dauer	Temperatur
Aceton	p. a.	2 x 30 min	0°C
Aceton	p. a.	30 min	0 → 4°C
Epon 25%	1 + 2	30 min	4 °C → 25°C
Epon 50%	1 + 1	30 min	25°C
Epon 75%	2 + 1	über Nacht (offen)	25°C
Epon	Pur	2 h	30°C
Epon	Pur	2 d	60°C

Vor der eigentlichen Polymerisation für 48 – 72 h bei 60°C wurden die Proben mit frisch angesetztem Epon für 2 h bei 30°C inkubiert, um etwaige Luftblasen entweichen zu lassen. Dazu wurden die Proben (Saphirplättchen in entspr. Präparathalter) in eine neue mit Etiketten versehene Reagenzienwanne überführt, und diese mit Epon gefüllt.

### 4.3 Ultramikrotomie

Mit der Ultramikrotomie können von Präparaten, nach geeigneter Stabilisierung, dünne und durchstrahlbare Schnitte für die Transmissions-Elektronenmikroskopie hergestellt werden. Je nach Fragestellung sind dünnere Ultra- (~50-100 nm) oder auch dickere Semi- (~100-250 nm für Elektronen-Tomographie) Dünnschnitte erforderlich. In jedem Fall muss das Präparat eine ausreichende Härte besitzen, damit es störungsfrei geschnitten werden kann. Mit Diamantmessern können von derart eingebetteten Proben (s. II.4.1 und II.4.2) Schnitte ohne mechanische Störungen hergestellt werden.

#### 4.3.1 Entfernen der Aufwachsmaterialien von eingebetteten Zellen

Um aus den eingebetteten Proben Ultradünn- bzw. Semidünnschnitte anzufertigen, waren einige notwendige Vorbereitungen zu treffen. Da die jeweiligen Zellen auf deren Zellkulturboden fixiert eingebettet wurden, musste dieser für die Weiterverarbeitung abgelöst werden.

##### Ablösen der $\mu$ -Dishes

Die bereits in Zellkultur durch lichtmikroskopische Kontrolle ausgewählten Zellen (Markierung am Schalenboden bzw. durch Grid-Position; s. II.4.1.1) wurden mithilfe einer Dekupiersäge (Rexon SS-13A mit Umbau auf Laubsägeblätter) in Form eines Blöckchens ausgeschnitten und dieses mit der Unterseite nach oben in einen universalen Präparathalter eingespannt. Auf das Blöckchen wurde ein Tropfen  $H_2O$  gegeben und unter Betrachtung im Stereomikroskop der Plastikboden mit einer dünnen Rasierklinge (Personna Super, American Safety Razor Company, Verona, USA) vorsichtig vom Harzblöckchen abgehoben. Der Wassertropfen sollte das Ablösen erleichtern und ein mögliches Zersplittern verhindern.

##### Absprengen der Träger inkl. Saphirplättchen

Bei den kryo-fixierten Proben wurde zuerst der Goldträger Epon-frei präpariert und anschließend durch sukzessives Eintauchen in flüssigen Stickstoff und Andrücken an eine vorgewärmte, an einem Metallblock integrierte Rasierklinge abgesprengt. Dabei sollte sich idealerweise auch das darunterliegende Saphirplättchen ablösen. War das nicht der Fall, wurde das Saphirplättchen erneut von umgebenden Epon frei präpariert und nach wiederholtem Eintauchen in flüssigem Stickstoff und Antauen vorsichtig mit einer Pinzette abgehoben.

#### 4.3.2 Trimmen der Kunststoff-Blöckchen

Die erhaltenen Kunststoff-Blöckchen wurden für die Ultramikrotomie weiter angetrimmt, was bedeutet, dass sie zur Probe hin angespitzt wurden, um beim Schneiden diese dann direkt zu erreichen. Bei besonders interessanten Arealen wurden die Blöckchen, nach Kontrolle eines Schnittes im Lichtmikroskop, einer Feintrimmung unterzogen. Zum Trimmen der Blöckchen standen unterschiedliche Geräte zur Verfügung. Die Blöckchen konnten am Pyramitome 11800 (LKB-BROMMA; Stockholm, Schweden) eingespannt und manuell mit Glasmessern zur gewünschten Form gebracht werden. Die dafür benötigten Glasmesser wurden an dem Glasmesserbrecher (Leica EM KMR3; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) gemäß der Bedienungsanleitung hergestellt. Weiterhin stand ein Hochgeschwindigkeitsfräßsystem mit integriertem Stereomikroskop, LED-Ringlicht und Absaugsystem mit HEPA-Filter (Probentrimmer für TEM, REM und LM Leica EM TRIM2; Leica

Microsystems GmbH, Wetzlar) zur Verfügung, bei dem die Proben entweder mit einem Hartmetall- oder auch einem Diamantfräser geformt werden konnten.

#### 4.3.3 Vorbereitung der Grids

Als Träger für die Ultradünnschnitte wurden mit Pioloform beschichtete Kupfer Grids (Agar, Slot 1 mm x 2 mm; Plano, Wetzlar) verwendet.

#### verwendete Lösungen

Pioloform-Lösung	1,5% Pioloform in Chloroform → Lagerung bei 4°C im Dunkeln
------------------	---

Dazu wurde ein vorher gut gereinigter Objektträger senkrecht in eine 1,5%ige Pioloform-Lösung getaucht. Beim Herausnehmen war der Objektträger im Idealfall gleichmäßig mit der Lösung benetzt. Beim Trocknen bildet sich eine Folie, die auf eine H<sub>2</sub>O-Oberfläche abflotiert wurde. Die Grids wurden anschließend vorsichtig mit der glänzenden Seite nach unten auf diesen Pioloform-Film gelegt. Die befilmten Grids konnten dann mit einem Streifen Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) von der Wasseroberfläche abgenommen werden. Nach Lufttrocknung konnten die Grids abgedeckt für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

#### 4.3.4 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Zur Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte standen mehrere Geräte zur Verfügung: EM UC6 und EM UC7-Ultramikrotome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) und Ultracut E-Mikrotom [Reichert-Jung (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)]. Durch eine konstante Winkeleinstellung zwischen Messer und Präparat und durch den mechanischen Vortrieb, wurde eine vorab einstellbare, konstant bleibende Schnittdicke gewährleistet. Die Schnittdicke konnte auch aufgrund der Interferenzfarben der Schnitte kontrolliert werden, welche bei 50 nm-Schnitten grau bis silbern und bei den 250 nm-Schnitten bläulich erschienen. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultra-Diamantmesser (Messerwinkel 35°, Messerbreite 3 mm; Diatome AG, Biel, CH) und die Semidünnschnitte wurden mit einem Histo-Diamantmesser (Messerwinkel 45°, Messerbreite 8 mm; Diatome AG, Biel, CH) angefertigt. Nach dem Einspannen und Justieren der Probe am Ultramikrotom wurde das Messer durch Auffüllen des dahinterliegenden Beckens mit H<sub>2</sub>O vollständig benetzt. Dadurch konnten die Schnitte auf die Wasseroberfläche aufschwimmen, von der sie anschließend mit der Hilfe eines sog. Perfect Loop (Diatome AG, Biel, CH) oder eines selbstkonstruierten sog. ‚Fishgrids‘ abgenommen wurden. Durch leichtes Aufsetzen des Loops bzw. des ‚Fishgrids‘ auf einem Pioloform-beschichteten Grid (s. II.4.3.3), konnte der Wassertropfen inkl. Ultradünnschnitt transferiert werden. Mit einem Stück Filterpapier (z. B. S & S Filterpapier Circles, Dassel) wurde vorsichtig das restliche Wasser abgesaugt und der Schnitt auf dem Grid luftgetrocknet.

### Herstellung von Serienschnitten

Bei der Herstellung von Serienschnitten war darauf zu achten, dass die untere sowie die obere Kante der Schnittfläche möglichst parallel angetrimmt waren. Die Schnitte bleiben so an diesen Kanten aneinander haften und werden als Band ins Wasserbad gebracht. Haftete das Schnittband trotzdem nicht gut aneinander, konnten die beiden Kanten der Schnittflächen mit einem Kontaktkleber (1:20-Verdünnung in Xylol von DAP® Weldwood® Contact Cement) benetzt werden. Das Schnittband wurde mit einer an einer Pasteurpipette befestigten Wimper festgehalten und wurde direkt mit dem Pioloform-beschichteten Kupfergrid vorsichtig abgenommen.

#### 4.3.5 Kontrastierung und Färbung von Schnitten

### Kontrastierung von Ultradünnschnitten

Biologische Proben zeigen nur einen minimalen Kontrast im Transmissions-Elektronenmikroskop. Um den Kontrast zu steigern, wird die Probe mit Schwermetallen imprägniert. Elektronen werden an Metallen stärker gestreut. Besonders Membranen erscheinen durch die gebundenen Schwermetalle nach der Kontrastierung dunkler. Dies kann noch vor dem Einbetten und Schneiden an der massiven Probe durch Immersion in Osmiumtetroxid und Uranylacetat erfolgen (= Blockkontrastierung; s. II.4.1.3 und 4.2.4). Falls der Kontrast der konventionell oder kryo-präparierten Zellen auf den Ultradünnschnitten jedoch nach wie vor zu schwach war, konnten diese nachträglich noch auf dem Schnitt kontrastiert werden (= Schnittkontrastierung). Uranylacetat erhöht den Gesamtkontrast der Zellkomponenten, da es den Kontrast proteinreicher Strukturen und Nukleinsäuren verbessert. Weiter verstärkt Bleicitrat (Reynolds, 1963) den Kontrast von Glykogen, Nukleotiden, SH-Gruppen einiger Proteine und mit Osmiumtetroxid reagierenden Verbindungen.

### **verwendete Lösungen**

Uranylacetat-Lösung	2% Uranylacetat in H <sub>2</sub> O (w/v) →ggf. pH-Wert auf 4,0 – 4,5 mit HAc einstellen →trübe Lösung wird dadurch auch klar
Bleicitrat-Lösung	80 mM Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 100 mM Natriumcitrat 16% NaOH (w/v) (CO <sub>2</sub> -frei) →mit CO <sub>2</sub> -freiem H <sub>2</sub> O auffüllen →pH 11,5 mit 1 M NaOH einstellen
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert

→Lösungen vor Gebrauch ~3 min bei 13.000 Upm (Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3328) zentrifugieren.



Die Grids wurden mit der Präparatseite nach unten auf einzelne Tropfen der Chemikalienlösungen aufgelegt. Zuerst wurden die Ultradünnschnitte 20-30 min in 2%iger Uranylacetatlösung inkubiert und die Probe dadurch positivkontrastiert. Anschließend wurden sie dreimal kurz auf Tropfen von H<sub>2</sub>O gewaschen (alternativ: Grid mehrere Male in ein mit H<sub>2</sub>O gefülltes Becherglas tauchen). Nachdem das Wasser mit einem Stück Filterpapier abgesaugt wurde, folgte ein weiterer Kontrastierungsschritt für 1 min in 0,5%iger Bleicitrat-Lösung (w/v). Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Flüssigkeit auf den Grids vollständig abgesaugt.

#### Färbung von Semidünnschnitten

Die 100-500 nm dicken Semidünnschnitte wurden zur lichtmikroskopischen Kontrolle nach der Richardson-Methode (Richardson, 1960) angefärbt.

<b>verwendete Lösungen</b>		
	<b>Lösung A</b>	<b>Lösung B</b>
Richardson-Lösung	1% Methylenblau in 1% wässriger Borax-Lösung (1:1 gemischt)	1% Mallory's Azur II in H <sub>2</sub> O
	→ Lösung A + B bei Bedarf 1:1 mischen und filtrieren	

Dazu wurden die Semidünnschnitte mit einem sog. ‚Fishgrid‘ von der Wasseroberfläche auf einen Objektträger transferiert und auf einer ~70°C warmen Heizplatte fixiert. Auf die Schnitte wurden Tropfen der Richardson-Lösung gegeben und bis zum Eintrocknen weiter auf der Heizplatte inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung mit H<sub>2</sub>O sorgfältig abgespült und die Schnitte getrocknet.

## 5 Mikroskopie

### 5.1 Lichtmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen im Rahmen der Zellkultur wurden an dem inversen Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Düsseldorf) durchgeführt. Sowohl der Zustand der Zellen als auch die Zelldichte im Verlauf der Inkubation in Kulturflaschen bzw. -schalen konnten mit den 4x- (NA 0,13) und 10x- (NA 0,25) Luftobjektiven (Nikon, Düsseldorf) sehr gut kontrolliert werden. Falls die Zelldichte bestimmt werden sollte, wurde eine Thoma-Zählkammer (Brand, Dietenhofen) in Verbindung mit einem 20x-Objektiv (Nikon, Düsseldorf) verwendet. Die Gesamtzellzahl ist aufgrund des vorgegebenen Volumens der Kammer (0,02 mm x 0,0025 mm<sup>2</sup> pro Kleinstquadrat) nach folgender Formel zu bestimmen:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate}} \right) \times 2 \times 10^7$$

## 5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde in erster Linie das inverse Axiovert200-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Als Objektive standen mehrere Luftobjektive zur Verfügung: 2,5x/0,075, 5x/0,25, 10x/0,30, 10x/0,50, 20x/0,50, 40x/0,75 (Zeiss, Oberkochen).

Je nach verwendeten Fluoreszenzfarbstoff wurden zur lichtmikroskopischen Detektion verschiedene Filter eingesetzt: Filter 38 (Anregung BP/ 470/40, Strahlteiler FT 495, Emission BP 525/50) für FLAsH und GFP; Filter 00 (Anregung BP 530-585, Strahlteiler FT 600, Emission LP 615) für ReAsH. Für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde an einem LSM 710 in Verbindung mit dem inversen Mikroskop Axio Observer (Zeiss, Oberkochen) gearbeitet.

## 5.3 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen standen zwei Transmissions-Elektronen-Mikroskope zur Verfügung. Zum einen ein CM 12 Transmissions-Elektronenmikroskop (120 kV; FEI Co., Eindhoven, NL), bei dem eine unten an der Säule angeflanschte Slow-Scan-CCD Kamera (TEM-1000, 1k x 1k; TVIPS-Tietz, Gauting) in Verbindung mit dem Anwendungsprogramm EM-Menü 4.0 zur digitalen Fotodokumentation diente. Am EM 902 (80 kV; Zeiss, Oberkochen) wurden die Bilder mit einer seitlich angeflanschten Slowscan-CCD-Kamera TRS (Tröndle; Moorenweis) aufgenommen, mit einer Spezialsoftware der Fa. Tröndle.

## 6 Elektronen-Tomographie

Sämtliche Elektronen-Tomographien im Rahmen dieser Arbeit wurden an Semidünnschnitten mit Dicken von 200-250 µm durchgeführt. Die Erstellung der Tomographien war unter anderem am institutseigenen CM12 Transmissions-Elektronenmikroskop (120 kV; FEI Co., Eindhoven, NL) möglich. Einige der in dieser Arbeit gezeigten tomographischen Ergebnisse resultieren allerdings aus einer Kooperation mit Prof. Margit Pavelka (Abteilung für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung, Institut für Histologie und Embryologie, Zentrum für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Universität Wien) unter Verwendung des Tecnai™ Transmissions-Elektronenmikroskop (200 kV; FEI Co., Eindhoven, NL), welches mit einer 1k-Slowscan-CCD-Kamera der Fa. Gatan ausgestattet war. Während der Messung, bei der die Probe bis zu  $\pm 65^\circ$  gekippt wurde (Kippwinkel-Inkrement  $1^\circ$ ), wurde das TEM durch die Tomographie-Software Xplore3D™ der Fa. FEI Co. (Eindhoven, NL) gesteuert, um das Abbild der Probe zu zentrieren und zu fokussieren, das Präparat zu kippen, und die Aufnahme zu erstellen.

## **7 3D-Rekonstruktion mit IMOD**

Bei IMOD handelt es sich um ein äußerst umfangreiches Programmpaket zur räumlichen Rekonstruktion von Objekten aus elektronenmikroskopischen Kippserien (Kremer et al., 1996). Die Bilder der resultierenden Kippserien (s. II.6) wurden mit diesem Programm einer groben Ausrichtung durch Kreuzkorrelation und Verfeinerung der Ausrichtung durch Verfolgung gewählter Marker unterzogen. Erst nach dieser Vorverarbeitung kann mit speziellen Algorithmen (WBP: ‚weighted back projection‘ [gewichtete Rückprojektion]; SIRT: ‚simultaneous iterative reconstruction tomography‘ [gleichzeitige iterative Rekonstruktion]) aus der modifizierten Kippserie das Tomogramm der Probe rekonstruiert werden. Eventuell auftretende Messungenauigkeiten werden durch entsprechende Rekonstruktionsalgorithmen berücksichtigt und teilweise korrigiert. Das resultierende Tomogramm konnte daraufhin dreidimensional oder entlang beliebig orientierter Schnitte (zweidimensional) ausgewertet werden.

Alle Programme von IMOD konnten unter Windows in Verbindung mit dem Linux-Emulator Cygwin genutzt werden. Genauere Anweisungen zur Anleitung und Bedienung dieses Programms sind dem IMOD-Manual (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>) und der Diplomarbeit von B. Salecker (Salecker, 2010) zu entnehmen.

## **8 3D-Modelle – Visualisierung der rekonstruierten elektronen-tomographischen Datensätze**

AMIRA® stellt ein wissenschaftliches 3D-Visualisierungs- und Grafikverarbeitungsprogramm dar, das auf den Life-Science-Bereich ausgerichtet ist. Schwerpunkte setzt AMIRA® in Bildregistrierung, Bildsegmentierung und 3D-Rekonstruktion biomedizinischer Daten.

„Amira ist ein wissenschaftliches Visualisierungssystem, das neben dem klassischen Repertoire an Visualisierungstechniken (z. B. Schnitte) besondere Schwerpunkte auf den Gebieten der interaktiven Bildsegmentierung, Rekonstruktion polygonaler Oberflächen und Tetraeder-Volumenmodelle, sowie der Volumenvisualisierung hat“ (Jutta Dreer, Leibniz-Rechenzentrum der Bayerischen Akademie für Wissenschaften). Es wurde mit dem ‚AMIRA base package‘ gearbeitet, das bereits eine Vielzahl von Modulen für die Anzeige, die Verarbeitung und die Analyse Ihrer Daten bereithält. Je nach Anwendung wurden zusätzliche Optionen verwendet. Auch hierzu sind Details zur Anleitung und Bedienung des Programms der Diplomarbeit von B. Salecker (Salecker, 2010) zu entnehmen.

## **9 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie**

Die korrelative Mikroskopie eröffnet die Möglichkeit, dieselbe Nanostruktur zunächst bei lichtoptischer Auflösung in der lebenden Zelle zu beobachten und dann fixiert und mit noch höherer Auf-

lösung elektronenmikroskopisch zu analysieren. Mit geeigneten Verfahren lassen sich Fluoreszenzen direkt oder indirekt im Elektronenmikroskop nachweisen. Es hat sich gezeigt, dass die Positionierung von Fluorophoren in Proteinen ein kritischer Punkt ist. GFP und seine Varianten können aufgrund ihrer Größe von ~27 kDa durchaus mit den Proteinstrukturen, an die sie fusioniert wurden, interferieren und deren Bewegung und Funktion massiv zu verändern (Andresen et al., 2004). Insbesondere können sie nicht an jeder beliebigen Stelle eines Zielproteins inseriert werden, ohne dessen strukturelle Integrität zu beeinflussen. Daher wurden Methoden entwickelt, bei denen die GFP-Varianten durch kleine Fluorophore ersetzt wurden. Diese Fluorophore können entweder kovalent an die zu untersuchenden Proteine gebunden werden, oder als Komplexe spezifisch an Aminosäureketten des Zielproteins binden. So können biarsenische Fluorophore spezifisch an Tetracystein-Motive gebunden werden. Eine solche spezifische Markierung eines Proteins mit einer fluoreszierenden Substanz über eine Tetracystein-Struktur wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um Roger Tsien veröffentlicht (Griffin et al., 1998). Hoffmann et al. (2005) haben diese Methode etabliert, um bei der Untersuchung der Aktivierung von G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) eines der GFP-Fluorophore durch ein kleineres Fluorophor zu ersetzen.

Inzwischen wurde eine ganze Reihe von biarsenischen Fluorophoren entwickelt, die spezifisch an Tetracystein-Sequenzen binden können. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf der Etablierung der Tetracystein-basierten Proteindetektion mittels des Resorufin-Derivats ReAsH (Resorufin Arsenical Hairpin Binder; Anregung 593 nm; Emission 608 nm) (Adams et al., 2002; Martin et al., 2005; Gaietta et al., 2006; Adams et al., 2008; Gaietta et al., 2011)

## **9.1 Klonierung von TC-Konstrukten**

Hierzu wurde eine Peptidsequenz, bestehend aus zwölf Aminosäuren in die zu markierenden Zielproteine (hier: Polycystin-2; Volllängen-Konstrukt und verkürztes 1/703-Konstrukt) eingebaut (s. II.1.5 & II.1.6.2). Die Tetracystein-Peptidsequenz besteht aus zwei Cysteinpaares, welche zwei in der Mitte liegende Aminosäuren flankieren (CCXXCC). Für die beiden Aminosäuren zwischen den Cysteinen wurden Prolin und Glycin definiert (CCPGCC), da dadurch die Stabilität zur Bindung zum ReAsH erhöht wurde (Adams et al., 2002).

## **9.2 Zellkultur**

Die jeweiligen Zielproteine mit dem Tetracystein-Tag wurden in Abhängigkeit von der Fragestellung in den entsprechend verwendeten renalen Tubulus-Epithelzellen (s. II.1.6.2) exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Versuche gestartet, stabile Zelllinien mit dauerhaft eingebauten Plasmiden im Genom zu generieren (s. II.2.6.2 Stabile Transfektion), als auch Experimente

durchgeführt, bei denen die jeweiligen Plasmide zeitweilig in das Genom eingebracht wurden (s. II.2.6.2 Transiente Transfektion).

Die Zellen wurden in den sog.  $\mu$ -Dishes Grid-500 (35 mm; ibidi GmbH, München; s. II.4.1.1) kultiviert. Diese ermöglichten zum einen die licht- bzw. fluoreszenzmikroskopische Analyse bei der Durchführung der ReAsH-Färbung (s. II.9.3) und der DAB-Photokonversion (s. II.9.4) und zum anderen wird durch das eingebrachte Koordinatengitter das Wiederfinden der Zellen erleichtert. Für die Fragestellung benötigten die Zellen eine nahezu 100%ige Konfluenz.

### 9.3 ReAsH-Färbung: Tetracystein-basierte Proteindetektion

ReAsH an sich ist eine nicht-fluoreszierende Verbindung, welche aber nach der Bindung an das im Zielprotein enthaltene Tetracystein-Motiv einen rot fluoreszierenden Komplex bildet. Dadurch können die Proteine *in-vivo* detektiert werden. ReAsH eignet sich auch für die Durchführung der nachfolgenden Photokonversions-Reaktion (s. II.9.4) (Adams et al., 2002; Gaietta et al., 2002, 2006; Lichtenstein et al., 2009). Für die *in-vivo*-Färbung der Zellen, die mit dem entsprechenden Tetracystein-Sequenz-enthaltenden Konstrukt transfiziert sind, wurden einige Lösungen im Vorfeld vorbereitet.

verwendete Lösungen	
1x HBSS-Puffer	Hanks' Balanced Salts-Puffer → von Sigma Aldrich bezogen
„ReAsH-EDT <sub>2</sub> -Färbereagenz“	2 mM ReAsH-EDT <sub>2</sub> in DMSO → fertig von Invitrogen bezogen
EDT-Lösung	25 mM 1,2-Ethandithiol in DMSO
→ ReAsH-EDT <sub>2</sub> Färbereagenz + EDT-Komplex-Lösung	1 + 1 Volumenanteile mischen → 1 mM ReAsH-EDT <sub>2</sub> → 12,5 mM EDT → 5-10 min bei RT
„BAL“-Waschpuffer	250 mM 2,3-Dimercaptoethanol in DMSO → auf 37°C vorwärmen
DMSO	von VWR bezogen
Kakodylat-Puffer	300 mM Kakodylsäure (Natriumsalz) in H <sub>2</sub> O → mit 0,1 N HCl auf pH 7,4 einstellen
Kakodylat-Puffer	100 mM Kakodylsäure (Natriumsalz) in H <sub>2</sub> O
2% GA-Lösung	2% Glutaraldehyd in 100 mM Kakodylat-Puffer
Blocking-Lösung	50 mM Glycin 10 mM Kaliumcyanid 10 mM Aminotriazole 0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 100 mM Kakodylat-Puffer → Lagerung bei 4°C

Vor der eigentlichen Färbung wurden die EDT-Lösung, das ‚ReAsH-EDT<sub>2</sub>-Färbereagenz‘ und die aus den beiden Komponenten bestehende ReAsH-EDT<sub>2</sub>-komplexbildende Lösung vorbereitet. Dann wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und diese zweimal in 1x HBSS-Puffer gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation für 1 h bei 37°C in der ReAsH-EDT<sub>2</sub>-Komplex-Lösung. Nach der *in-vivo*-Färbung wurden die Zellen 10 min mit dem auf 37°C vorgewärmten ‚BAL‘-Waschpuffer bei 37°C inkubiert und weiterhin zweimal mit dem Puffer gespült. Die ReAsH-gefärbten Zellen wurden für die weitere Verarbeitung mit 2% GA-Lösung 15 min bei RT fixiert und zum Schluss auf Eis gestellt. Danach folgten fünf einminütige Waschschriffe in 100 mM Kakodylat-Puffer. Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung wurde die kalte Blocking-Lösung für mindestens 30 min auf die Zellen gegeben (Lösung kann beliebig lange auf den Zellen bleiben). Daraufhin wurden die Zellen erneut dreimal für je 1 min in 100 mM Kakodylat-Puffer gewaschen.

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde das Axiovert200-Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) verwendet, welches dafür mit einem temperaturkontrollierten O<sub>2</sub>-Inkubationssystem präpariert wurde. Der Metalleinsatz (Biologie-Werkstatt, Universität Regensburg) am Objektisch wurde mithilfe eines Durchlaufkühlers (2219 Multitemp™, Thermo Scientific Circulator; LKB BROMMA, Stockholm, Schweden) auf 0°C temperiert. Die für die Photokonversions-Reaktion notwendige O<sub>2</sub>-Zufuhr wurde über eine mit einem Plastikschauch versehene O<sub>2</sub>-Flasche gewährleistet. Dieser wurde direkt über der späteren Probe angebracht. Die eisgekühlte Probe wurde dann in den vorgekühlten Probenhalter am Mikroskop gestellt, eine geeignete Stelle für die Photokonversion ausgesucht und die Position mittels des im  $\mu$ -Dish integrierten Koordinatensystems notiert.

#### 9.4 Photokonversion mit Diaminobenzidin (DAB)

Fluoreszenz-Photokonversion ist ein Prozess, bei dem eine fluoreszierende Verbindung (hier: ReAsH-Tetracystein-Komplex; s. I.4.2 und II.9.3) mit einer hohen Lichtintensität angeregt wird. Dabei entsteht reaktiver Singulett-O<sub>2</sub>, welcher hierbei für die Oxidation von DAB benötigt wird. Dadurch bildet sich wiederum ein unlösliches DAB-Polymer, welches als braunes Präzipitat im Lichtmikroskop verfolgt werden kann.

verwendete Lösungen	
Photokonversions-Stammlösung	1 mg/ml DAB in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> → 1 ml-Aliquots in fl. N <sub>2</sub> schockgefrieren → Lagerung bei -80°C
Photokonversions-Lösung	1:10-Verdünnung der DAB-Stammlösung in 100 mM Kakodylatpuffer → auf Eis stellen → mit O <sub>2</sub> begasen
Kakodylat-Puffer	100 mM Kakodylsäure (Natriumsalz) in H <sub>2</sub> O

Nach Identifizierung einer oder mehrerer geeigneter Stellen wurde die Blocking-Lösung bzw. der Kakodylat-Puffer (s. II.9.3) von den Zellen abgenommen, die kalte DAB-Photokonversions-Lösung auf die Zellen gegeben und erneut am Mikroskopisch platziert. Der an einer O<sub>2</sub>-Flasche angebrachte Schlauch wurde direkt über der Zellkulturschale positioniert, damit die Lösung ständig mit O<sub>2</sub> überströmt werden konnte. Zur Photokonversions-Reaktion wurden die ausgesuchten Zellen punktförmig mit Licht einer Wellenlänge von 585 nm (Quecksilberlampe HBO100 mit Vorschaltgerät ebq100; Leistungselektronik Jena GmbH, Jena) bestrahlt. Während der Bestrahlung wurde zwischenzeitlich die DAB-Photokonversions-Lösung gewechselt. Die Reaktion wurde nach einigen Minuten lichtmikroskopisch im Hellfeld kontrolliert; das sich ausbildende DAB-Polymer wurde als bräunliches Präzipitat sichtbar. Im Verlauf der für diese Arbeit relevanten Experimente wurden die Proben durchschnittlich zwischen 8-11 min bestrahlt. Die Reaktion wurde durch Beenden der Bestrahlung gestoppt. Vor Beginn der Bestrahlung von weiteren Zellen wurde die Lösung abgenommen und die Zellen kurz mit 100 nM Kakodylat-Puffer gewaschen, um die ReAsH-Fluoreszenz zu regenerieren, anschließend erneut mit DAB-Lösung versetzt und mit O<sub>2</sub> überströmt.

### 9.5 Nachfixierung und Kontrastierung mit OsO<sub>4</sub>

Das bei der Photokonversion gebildete unlösliche DAB-Polymer wirkt sehr stark osmiophil; es lagert sich mit OsO<sub>4</sub> zu einem elektronendichten Komplex zusammen, welcher anschließend im Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbar ist.

#### verwendete Lösungen

Kakodylat-Puffer	100 mM Kakodylsäure (Natriumsalz) in H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O	→ auf Eis stellen
OsO <sub>4</sub> -Lösung	1% OsO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
UAc-Lösung	1% UAc in H <sub>2</sub> O

Nach der Photokonversion wurden die Zellen fünfmal für je 3 min in 100 mM Kakodylat-Puffer gewaschen und anschließend in 1%iger OsO<sub>4</sub>-Lösung 30 min auf Eis nachfixiert, wobei OsO<sub>4</sub> zusätzlich als Kontrastierungsmittel fungiert. Daraufhin folgten zwei Waschschrte in eiskaltem 100 mM Kakodylat-Puffer und drei Waschschrte in eiskaltem H<sub>2</sub>O für je 1 min. Weiterhin wurden die Zellen über Nacht in 25%iger UAc-Lösung inkubiert und am nächsten Tag fünfmal für je 1 min in H<sub>2</sub>O gewaschen.

## 9.6 Entwässerung, Infiltration und Einbettung in Epon/Durcupan

Die Entwässerung der Proben erfolgte wie in II.4.1.4 beschrieben:

verwendete Lösungen für Entwässerung	
aufsteigende Ethanol-Reihe	20%, 50%, 70%, 90%, 100% in H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O	→autoklaviert in 50-100 ml Schottflaschen

Die ReAsH-gefärbten, DAB-photokonvertierten, osmierten und entwässerten Zellen wurden hauptsächlich in Durcupan eingebettet (s. II.4.1.5).

verwendete Lösungen für Durcupan-Einbettung	
Ethanol	p. a.
Epoxy-Harz (A)	11 g
Härter 964 (B)	10 g
Beschleuniger 960 (DY 060) (C)	0,3 g
Weichmacher (D)	0,1 g

## 9.7 Ultramikrotomie

Nach der Polymerisation (s. II.4.1.5) wurden von den eingebetteten Zellen ~50 µm-Ultradünnschnitte in Serie hergestellt. Dazu wurde im Grunde genommen wie in II.4.3 beschrieben vorgegangen. Allerdings musste zuerst exakt die Zelle bzw. der Bereich identifiziert werden, welche/r photokonvertiert wurde. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit integriertem Koordinatensystem (µ-Dish<sup>35mm</sup>, ibidi GmbH, München; s. auch 4.1.1 und 9.2) kultiviert, anhand dessen Positionen leichter wiederzufinden waren. Anschließend wurde die jeweilige Position markiert und in Form eines kleinen Eponblöckens aus der Schale gesägt. Das Blöckchen wurde mit der Boden-seite nach oben in einen Halter eingespannt und das Stück des Schalenbodens mit Hilfe eines Wassertropfens obenauf, welcher das Zersplittern des Kunststoffes verhindern sollte und einer feinen Rasierklinge abgesprengt (s. II.4.3.1). Daraufhin wurde das Eponblöckchen für die Ultramikrotomie in Form getrimmt (Pyramitome 11800, LKB-BROMMA, Stockholm, Schweden; Proben-trimmer für TEM, REM und LM Leica EM TRIM2; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar; s. auch II.4.3.2 – II.4.3.4). Eine nachträgliche Schnittkontrastierung war nicht mehr nötig, da ansonsten



---

die in den Zellen erfolgte Photokonversionsreaktion und das daran gebundene  $\text{OsO}_4$  (s. II.9.4) ausreichend kontrastreich war und dadurch eventuell auch verfälscht werden konnte.

## **9.8 Elektronenmikroskopie**

Die transmissionselektronischen Aufnahmen fanden wie in II.5.3 beschrieben an zwei Transmissions-Elektronenmikroskopen (CM 12 Transmissions-Elektronenmikroskop, 120 kV; FEI Co., Eindhoven, NL und EM 902, 80 kV; Zeiss, Oberkochen) statt.

### III Ergebnisse

Die molekularen Ursachen für die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) sind Mutationen im *PKD1*- (85% aller Fälle) und *PKD2*-Gen (15% aller Fälle), die für die Proteine Polycystin-1 (Hughes et al., 1995) und Polycystin-2 kodieren (Boucher and Sandford, 2004; s. Einleitung). Diese integralen Membran-Glykoproteine wurden im primären Zilium nachgewiesen (Nauli et al., 2003; Yoder et al., 2002; Pazour et al., 2002b). In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem der TRP-Superfamilie zugehörigen Polycystin-2 (Mochizuki et al., 1996; Zhu et al. 1996).

Die Arbeit gliederte sich in zwei Hauptaspekte, die untersucht wurden. Zum einen sollte die Fragestellung des intrazellulären Transports in das primäre Zilium untersucht und zum anderen die Ultrastruktur der basalen Struktur des primären Ziliums charakterisiert werden. Dazu wurden mehrere Präparationsmethoden für die Transmissions-Elektronenmikroskopie der eingesetzten Zellsysteme etabliert. Für die Untersuchungen des Proteintransports wurde die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie herangezogen; hierfür wurde die Methode der Tetracystein-basierten Proteindetektion mittels des Resorufin-Derivats ReAsH (s. I.4.2 und II.9) an diversen Nierenepithelzellen verwendet. Zur morphologischen Charakterisierung des primären Ziliums wurden ebenfalls diverse Zilien-tragende Nierenepithelzelllinien untersucht, welche durch Hochdruckgefrieren in einem möglichst nativen Zustand kryo-immobilisiert wurden. Dies sollte eine bestmögliche Strukturhaltung der zellulären Bestandteile gewährleisten; v. a. die des filigranen primären Ziliums. Die Erstellungen von TEM-Tomographien, 3D-Rekonstruktionen und –Visualisierungen dieser Strukturen sollten Aufschluss über die genaue Morphologie des primären Ziliums und der sie exprimierenden Zellen geben.

#### 1 Etablierung der Tetracystein-basierten Protein-Detektionsmethode mittels FLAsH™ und ReAsH™

Aus früheren Arbeiten am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie an der Universität Regensburg (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008) sowie weiteren Publikationen (Geng et al., 2006; Yoder et al., 2002) war bereits bekannt, dass Polycystin-2 in das primäre Zilium transportiert wird. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden.

Eine besondere Form der korrelativen Mikroskopie ist die Analyse von Zellen, welche fluoreszierende Proteine exprimieren. Mit geeigneten Verfahren lassen sich die Fluoreszenz-markierten Proteine auch im Elektronenmikroskop nachweisen und ihre subzelluläre Lokalisation mit höherer Auflösung als im Lichtmikroskop untersuchen. Für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie wurden Zellen mit unterschiedlichen DNA-Konstrukt-Variationen transfiziert (s. II.2.6.2). Die Kon-

strukturen enthielten jeweils die Sequenz, welche für das Protein Polycystin-2 kodiert, einen HA-Tag zur immunzytochemischen Kontrolle (s. II.2.6.5) und das Tetracystein-Motiv (s. I.4), an welches das ReAsH-Reagenz bindet, welches dadurch fluoresziert und anschließend mittels einer Photooxydations-Reaktion im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden kann (s. II.9.3, II.9.4).

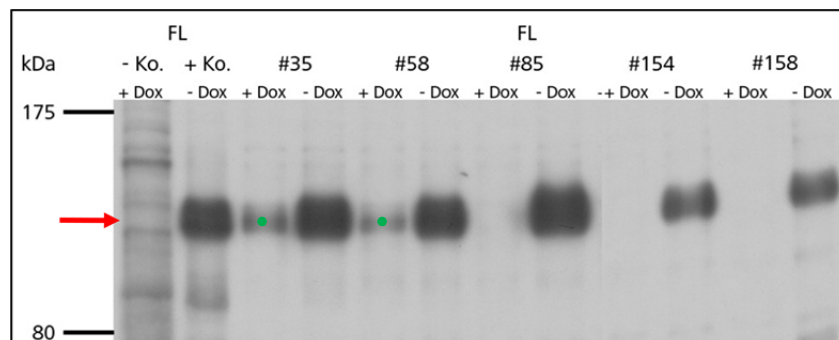
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen geben unter anderem Aufschluss über die subzelluläre Verteilung von fluoreszierenden Proteinen / Biomolekülen in Zellen. Da nicht-markierte Biomoleküle jedoch unsichtbar sind und die Fluoreszenz eine Streuung aufweist, ist die Lokalisation nicht ortsgenau; insbesondere fehlt der Bezug zur hochaufgelösten Ultrastruktur der Zelle, wie ihn die Elektronenmikroskopie unmittelbar liefert. Um diese Zusammenhänge herzustellen, wird in der Zellbiologie zunehmend die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (s. I.4.2 und II.9.1 – 9.8) eingesetzt, wobei die im Lichtmikroskop fluoreszierende Struktur im Elektronenmikroskop mit höherer Auflösung lokalisiert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich hauptsächlich um den intrazellulären Proteintransport des integralen Membranproteins Polycystin-2 (s. I.1.2). Daher wurden zu Beginn verschiedene DNA-Konstrukte (s. II.1.5.1) hergestellt, die das für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH notwendige Tetracystein-Motiv enthielten. Nach erfolgter Fluoreszenz-Kontrolle wurde die Probe an gewünschter Position im chemisch-fixierten Zustand photooxidiert (s. II.9.4). Für die Korrelation zwischen lichtmikroskopischer und elektronenoptischer Bildinformation stehen geeignete Verfahren der Probenpräparation zu Verfügung. So werden die Zellen bereits zu Beginn des Versuchs in Kulturschalen mit integriertem Koordinatensystem (s. II.9.2) kultiviert, um das Wiederfinden von Objekten im Elektronenmikroskop zu gewährleisten. Nach der Behandlung mit DAB und  $\text{OsO}_4$  und weiterer elektronenmikroskopischer Probenpräparation (s. II.9.5 – 9.7) konnte das Reaktionsprodukt der Photokonversion, welches sich in einer Schwarzfärbung der zuvor fluoreszierenden Struktur im Elektronenmikroskop zeigte, bei hoher Auflösung betrachtet und analysiert werden.

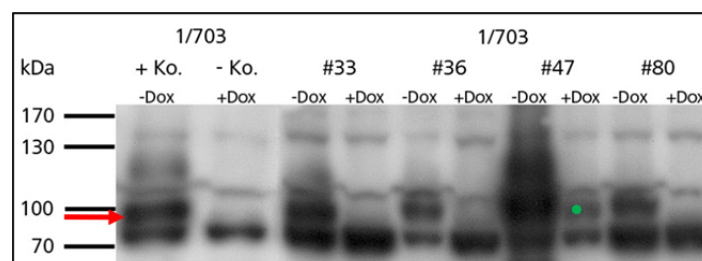
### **1.1 Generierung stabiler Zelllinien für die Tetracystein-basierte Proteindetektion**

Bei einer stabilen Transfektion wird das jeweilige DNA-Konstrukt, welches für das gewünschte Protein kodiert, dauerhaft in das Genom der Zielzellen eingebaut (s. II.2.6.2). Dazu wurden die Schweinenieren-Epithelzellen LtTA-2,22 (s. II.1.6.2) verwendet; diese von der LLC-PK<sub>1</sub>-Zelllinie abgeleiteten Zellen exprimieren einen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator. Mit diesem sog. Tet-System kann die Proteinproduktion mithilfe von Tetrazyklin-Derivaten (hier: Doxzyklin) reguliert werden (s. II.2.6.3). Da die Zellen erst im nicht mehr proliferierenden, ausdifferenzierten Zustand primäre Zilien an ihrer apikalen Oberfläche ausbilden (s. I.2) und es sich hierbei schließlich um

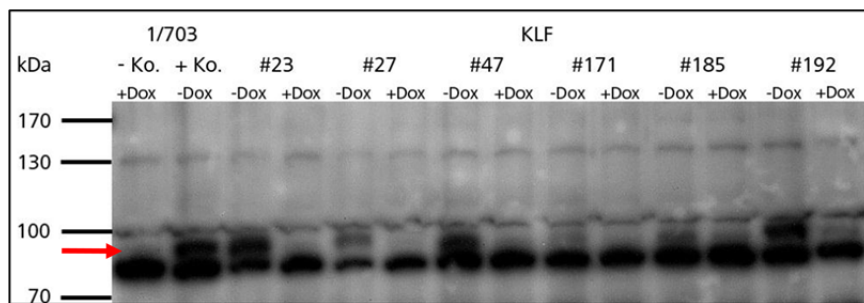
die Fragestellung des Proteintransports in das primäre Zilium handelte, wurden die Zellen unter regelmäßigem Mediumwechsel bis annähernd 100% Konfluenz kultiviert. Zur Kontrolle wurde parallel ein immunzytochemischer Nachweis (s. II.2.6.5) mittels des Primärantikörpers gegen azetyliertes Tubulin durchgeführt, welcher mit einem FITC- bzw. Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (s. II.1.4) detektiert wurde. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse (s. II.5.2) konnten die grün oder rot fluoreszierenden primären Zilien beobachtet werden (vgl. Abb. 13). Zur Überprüfung, ob die stabil transfizierten Zelllinien das jeweilige Protein exprimieren, wurden diese immunologisch getestet. Die Abbildungen 11a – d zeigen Westernblots von Proteinextrakten von Klonen stabil transfizierter LtTA-2,22-Zellen, welche sowohl im induzierten (-Dox) als auch nicht-induzierten (+Dox) Zustand nahezu 100% konfluent kultiviert und anschließend lysiert wurden (s. II.2.6.4). Jeweils 30 µg der Proteinextrakte wurden einer SDS-PAGE (s. II.3.2) unterzogen und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. II.3.3). Die Immundetektion erfolgte mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Primärantikörper (12CA5; s. II.1.4), der mittels eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (s. II.1.4) und Inkubation mit dem Western Lightning Chemoluminescence Reagenz (s. II.3.3.2) auf einem Röntgenfilm nachgewiesen wurde.



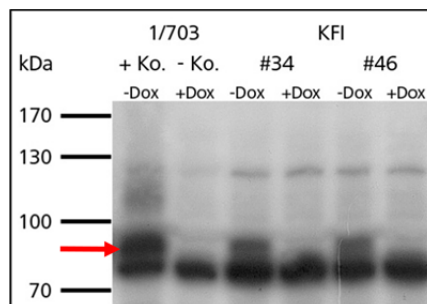
**Abb. 11a: Expression von PC2, HA, TCM in LtTA-2,22-Zellen.** Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für Polycystin-2 (PC2), HA an, welches in den fünf gezeigten Klonen (#35, #58, #85, #154, #158) inkl. des TC-Motivs exprimiert wurde.



**Abb. 11b: Expression von PC2 (1/703), HA, TCM in LtTA-2,22-Zellen.** Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für Polycystin-2 (PC2) (1/703), HA an, welches in den vier gezeigten Klonen (#33, #36, #47, #80) inkl. des TC-Motivs exprimiert wurde.



**Abb. 11c: Expression von PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS) in LtTA-2,22-Zellen.** Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für PC2 (1/703), HA an. Die PC2-Alanin-Mutante PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM, wurde in den sechs gezeigten Klonen (#23, #27, #47, #171, #185, #192) exprimiert.



**Abb. 11d: Expression von PC2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS) in LtTA-2,22-Zellen.** Der Pfeil zeigt die Laufhöhe für PC2 (1/703), HA an. Die PC2-Alanin-Mutante PC2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM, wurde in den zwei gezeigten Klonen (#34, #46) exprimiert.

**Abb. 11: Expressionstest von Polycystin-2 und Mutanten.** Stabil transfizierte LtTA-2,22-Zellen wurden lysiert (II.2.6.4) und 30 µg des Lysats auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel (II.3.2) aufgetragen, welches anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (II.3.3.1) wurde, die mit einem gegen den HA-tag gerichteten Antikörper 12CA5 (II.1.4) inkubiert wurde. Die Bandendetektion erfolgte durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (II.1.4) und dem Western Lightning Chemoluminescence Reagenz zur Entwicklung mittels eines Röntgenfilmes (II.3.3.2).

Das Molekulargewicht des Volllängen-PC2-Proteins, welche als Positivkontrolle für die PC2, HA, TCM-Klone verwendet wurde, betrug 110 kDa (Abb. 11a; roter Pfeil). Die Kontrolle für die PC2 (1/703)-Deletions- und Alanin-Mutanten stellt die PC2 (1/703)-Deletionsmutante selbst dar, bei welcher das Protein eine Molekularmasse von ~81 kDa aufwies (Abb. 11 b – d; roter Pfeil).

In Abb. 11a sind die Proteinbanden des Volllängen-PC2-Proteins zu sehen. Die ersten beiden Spuren zeigen die Negativ- (+Dox) und Positivkontrolle (-Dox) des PC2 FL-Proteins. Alle anderen Spuren zeigen PC2 FL, HA, TCM-Proteinbanden von induzierten (-Dox) als auch nicht-induzierten Klonen (#35, #58, #85, #154, #158). Bei zwei nicht-induzierten Klonen (+Dox) war eine schwache Proteinbande zu erkennen (s. grüne Punkte: #35, #58)

Die Abb. 11b zeigt neben den ersten beiden Positiv- und Negativkontrollen Proteinbanden von vier sowohl induzierten (-Dox) als auch nicht-induzierten (+Dox) Proteinbanden von LtTA-2,22/PC2

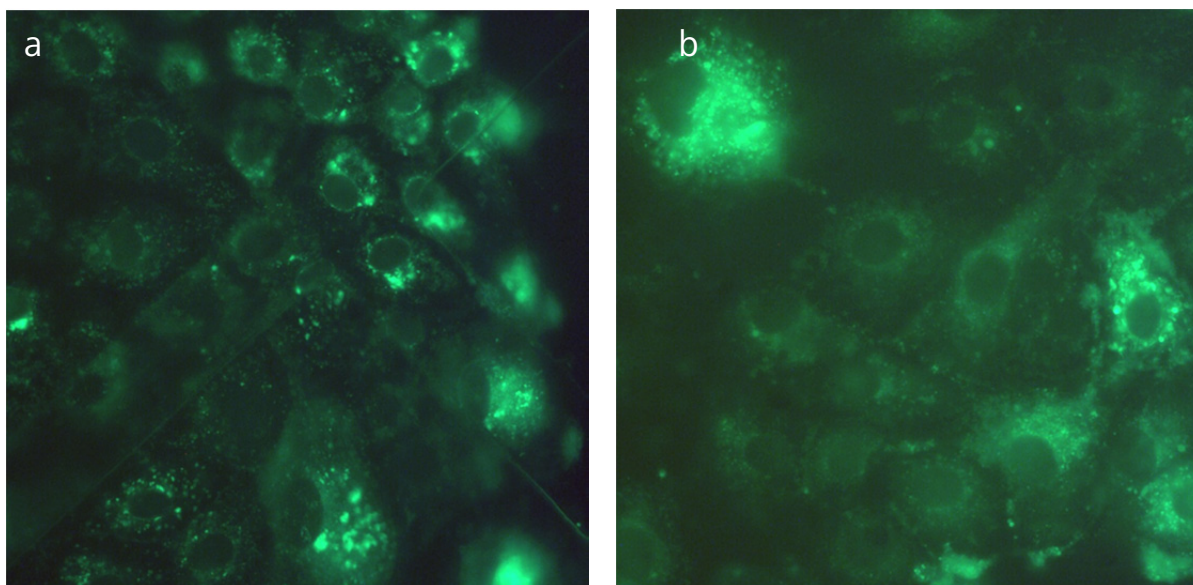
(1/703), HA, TCM-Klonen (#33, #36, #47, #80). In der +Dox-Spur von Klon #47 ist ebenfalls eine schwache Bande zu erkennen (s. grüner Punkt), welche auf einen ‚undichten‘ Promotor zurückzuführen ist.

In den Abb. 11 c und d sind die PC2-Triple-Alanin-Mutanten (PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS) und PC2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS) aufgetragen. Die ersten beiden Spuren zeigen jeweils wieder die induzierte Positivkontrolle PC2 (1/703), HA, TCM mit einer Laufhöhe von ~81 kDa und die nicht-induzierte Negativkontrolle davon (in Abb. 11c umgekehrt dargestellt). Von der KLF-Mutante exprimierten sechs Klone das PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM-Protein (Abb. 11c: #23, #27, #47, #171, #185, #192), wohingegen von der KFI-Mutante nur zwei Klone identifiziert werden konnten, welche das PC2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM-Protein exprimierten (Abb. 11d: #34, #46).

Alle stabil transfizierten LtTA-2,22 Klone enthielten im Gegensatz zu den Kontrollen ein zusätzliches Tetracystein-Motiv (TCM) mit einer molekularen Masse von ~1 kDa. Aufgrund dieser kleinen Molekularmasse des TC-Motivs ist im Vergleich zu den jeweiligen Positiv-Kontrollen (-Dox) kein Unterschied in der Laufhöhe der Proteinbanden zu erkennen. Die in allen Spuren der PC2-Deletions- und PC2-Triple-Alanin-Mutanten (Abb. 11 b – d) auftretende untere Bande bei ca. 75 kDa ist auf eine unspezifische Reaktion des Primärantikörpers zurückzuführen.

## 1.2 Tetracystein-basierte Proteindetektion mittels FIAsh™

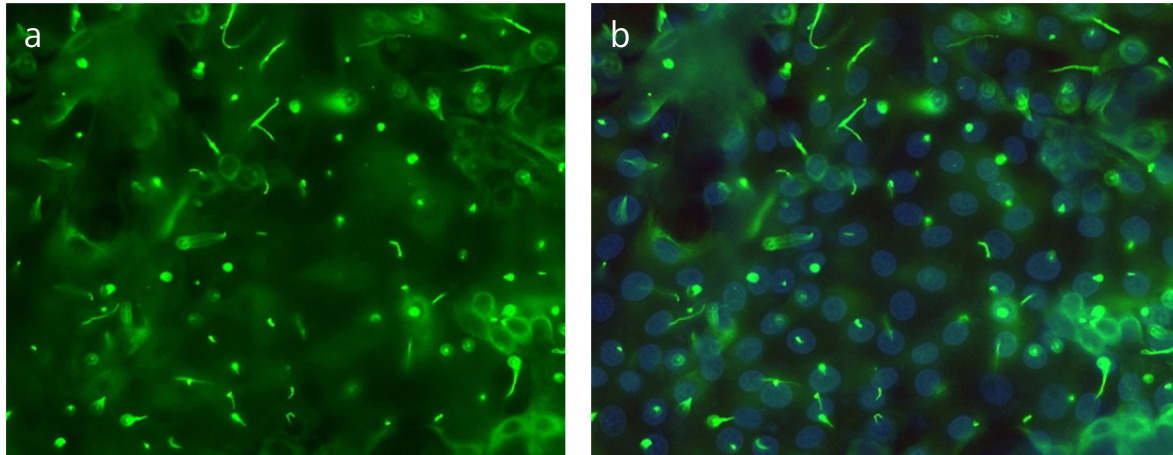
Die Protein-Detektionsmethode mittels des *TC-FIAsh™ In-Cell Tetracysteine Tag Detection kits* (Invitrogen; s. II.1.7) eignet sich zur Lebend-Zell-Mikroskopie. Zu den unter III.1.1 vorgestellten stabil transfizierten LtTA-2,22 Klonen, welche das jeweilige PC2-Protein inkl. HA-tag und TC-Motiv exprimierten, wurde das ‚FIAsh-EDT<sub>2</sub>-Färbereagenz‘ gegeben, welches an die Tetracystein-Sequenz bindet und anschließend fluoresziert (s. I.4.1; II.2.6.6). Somit konnte die Lokalisation des jeweiligen Proteins in den lebenden Zellen verfolgt werden. Zur Etablierung dieser Methode wurden zahlreiche Parameter des Protokolls (s. II.2.6.6) variiert, bis die spezifische Fluoreszenz optimiert und unspezifische Hintergrundfärbung minimiert werden konnten. Zudem wurde ein am Institut für Organische Chemie (Prof. B. König, Universität Regensburg) eigens synthetisiertes ‚FIAsh-EDT<sub>2</sub> Färbereagenz‘ erfolgreich eingesetzt und optimiert (s. Protokoll 2.6.6).



**Abb. 12: Expression von PC2, HA, TCM in LtTA-2,22-Zellen.** Grün leuchtende FISH-Fluoreszenz im endoplasmatischen Retikulum und im Bereich des Golgi-Apparates. **a)** FISH-Färbung mit von Invitrogen bezogenem FISH-EDT<sub>2</sub>-Färbereagenz. **b)** FISH-Färbung mit eigens synthetisiertem FISH-Färbereagenz (Prof. B. König, Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Regensburg).

In Abb. 12a sind stabil transfizierte LtTA-2,22/PC2, HA, TCM-Zellen zu sehen, welche mit dem industriellen ‚FISH-EDT<sub>2</sub>-Färbereagenz‘ behandelt wurden. Es ist zu erkennen, dass nicht jede Zelle das Volllängen-PC2-Protein exprimiert. In den Zellen, die dieses Protein exprimieren, ist deutlich die Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum und im Bereich des Golgi-Apparates anhand der grünen Fluoreszenz auszumachen. Im Hintergrund ist eine kreuzförmige Struktur zu erahnen, die vom integrierten Koordinatensystem am Kulturgefäßboden ( $\mu$ -Dish<sup>35mm</sup>, ibidi GmbH, München) stammt, welches hilfreich bei der Wiederfindung interessanter Positionen ist. Auch mit dem eigens synthetisierten ‚FISH-EDT<sub>2</sub>-Färbereagenz‘ (Prof. B. König, Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Regensburg) konnte die Proteindetektion erfolgreich durchgeführt werden. In Übereinstimmung ist auch hier die Lokalisation des Volllängen-PC2 im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat zu erkennen (Abb. 12b). Primäre Zilien sind in beiden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht sichtbar, da das Volllängen-PC2 mit den bis zu diesem Zeitpunkt vorhandenen PC2-Volllängen-cDNA-Konstrukten nicht ins Zilium transloziert wurde (s. I.1.2.3). Versuche mit stabil transfizierten Zellen mit der PC2 (1/703), HA, TCM-Deletions- und den beiden PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS)- und PC2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS)-Alanin-Mutanten führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Während der Mikroskopie konnten dabei zwar schwach grün fluoreszierende primäre Zilien beobachtet werden, jedoch reichte die durch den Belichtungsvorgang schnell verbleichende Fluoreszenz nicht für eine Bilddokumentation aus (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nicht gezeigt).

Parallel wurden immer immunzytochemische Kontrollen (s. II.2.6.5) mitgeführt, um zu überprüfen, ob die kultivierten, transfizierten Zellen tatsächlich primäre Zilien tragen. Dazu wurde der gegen das azetylierte Tubulin bindende Primärantikörper (6-11B-1; s. II.1.4) verwendet, welcher mit einem FITC- oder Cy3- gekoppelten Sekundärantikörper (s. II.1.4) detektiert wurde.



**Abb. 13: Immunzytochemische Lokalisation von Zilien in stabil transfizierten LtTA-2,22/PC2 (1/703), HA, TCM-Zellen. a)** Primärantikörper: Maus anti-acetyliertes Tubulin (6-11B-1) [1:200], Sekundärantikörper: FITC-Ziege-anti-Maus [1:200] **b)** blaue Kernfärbung mit Hoechst 33258 [1:500; Stammkonz. 5 mg/ml]

In Abb. 13a ist die Lokalisation von Zilien in LtTA-Zellen mit primären Antikörpern gegen acetyliertes Tubulin und einem FITC-markierten Sekundärantikörper zu sehen. Die grüne Fluoreszenz zeigt deutlich die unterschiedlich langen und zum Teil aus der Bildebene herausragenden primären Zilien. In den darunterliegenden Ebenen sind die dazugehörigen Zellkörper zu erkennen. Überlagert man diese Aufnahme mit der Hoechstfärbung der Zellkerne, wie in Abb. 13b gezeigt, erkennt man deutlicher, dass die primären Zilien in einer anderen Fokusebene liegen als deren Zellkörper bzw. -kerne. Diese Tatsache erschwert fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gesamten Zellen inkl. der primären Zilien, auch im Hinblick auf die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie mittels des lichtinstabilen Farbstoffes ReAsH (s. III.1.3). Es ist allerdings zu erkennen, dass nahezu jede Zelle ein primäres Zilium besitzt.

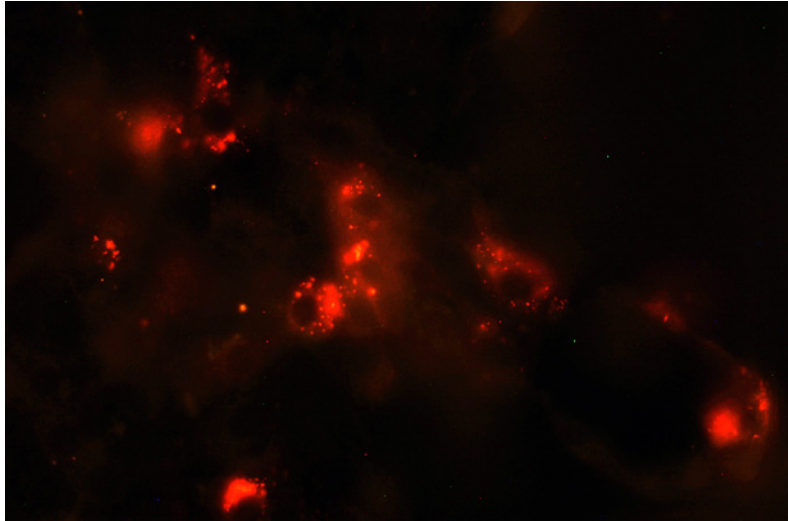
### 1.3 Tetracystein-basierte Proteindetektion mittels ReAsH™

Auch das ‚ReAsH-EDT<sub>2</sub>-Färbereagens‘ kann für die Lebend-Zell-Mikroskopie eingesetzt werden. Hierfür wurden ebenfalls alle notwendigen Parameter des Protokolls angepasst und optimiert (s. II.9.3).

Bei den Versuchen für die *in vivo*-Färbung von stabil transfizierten LtTA-2,22-Zellen mit PKD2-cDNAs, welche ein Tetracystein-Motiv (TCM) enthielten, kam es zu vergleichbaren Aufnahmen wie bei der Färbung mit dem FIASH-Reagens; ReAsH-EDT<sub>2</sub> gebunden an das TC-Motiv, ergab einen rot fluoreszierenden Komplex (s. Abb. 14). Es traten die gleichen Problematiken bezüglich der un-



terschiedlichen Fokusebenen von Zellkörper und primären Zilien und der Instabilität der Fluoreszenz während der Belichtung auf (vgl. III.1.2). Zugleich wurden auch hierzu parallel immer immunzytochemische Versuche durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die jeweiligen Zellen zum Versuchszeitpunkt bereits primäre Zilien ausgebildet hatten (s. Abb. 13).



**Abb. 14: Expression von PC2, HA, TCM in LtTA-2,22-Zellen.** Rot leuchtende ReAsH-Fluoreszenz im endoplasmatischen Retikulum und im Bereich des Golgi-Apparates. ReAsH-Färbung mit von Invitrogen bezogenem ReAsH-EDT<sub>2</sub>-Färbereagenz.

## 2 Etablierung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH™

### 2.1 Transiente Protein-Expression für die Tetracystein-basierte Detektion mittels ReAsH™

Im Vergleich zur stabilen Transfektion ist die Expressionsrate bei einer transienten Transfektion mitunter um ein Vielfaches höher (persönliche Mitteilung Prof. Witzgall). Für die Durchführung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie mithilfe des ‚ReAsH™-Färbereagenzes‘ war eine höhere Proteinexpression nötig, um die rot leuchtende Fluoreszenz für die Photokonversions-Reaktion (s. I.4.2, II.9.3) verwenden zu können.

Es wurden sowohl mehrere Nieren-Zelllinien, wie LLC-PK<sub>1</sub>, HEK-293T und COS-7 (s. II.1.6.2 und II.2.6.1), als auch diverse Transfektions-Reagenzien, wie Lipofectamine™ 2000 und DEAE-Dextran getestet und optimiert (s. Protokolle II.2.6.2). Allerdings war auch nach den diversen transienten Transfektionen und erfolgten ReAsH™-Färbungen die rote Fluoreszenz, v. a. in den primären Zilien, wiederum nicht ausreichend für Detektion und Photokonversions-Reaktion (Aufnahmen nicht gezeigt). Zur Etablierung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH™ wurde zunächst eine zusätzliche GFP-Sequenz in die verschiedenen PKD2-cDNA-Konstrukte eingebaut, um eine interne fluoreszierende Kontrolle zu besitzen. Dabei musste jedoch in Kauf genommen werden, dass das Volllängen-PC2 mit GFP nicht ins primäre Zilium transportiert wird,

wie Ergebnisse früherer Experimente zeigten (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008). Daher wurde die Lokalisation des GFP im Volllängen-PC2 -Konstrukt variiert (s. IV.1.1; IV.2.1.3).

## 2.2 Golgi-Transport und Zytoplasmamembran-Lokalisation

Zur Etablierung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH<sup>TM</sup> wurden zunächst COS-7 Zellen (s. II.1.6.2) transient transfiziert, welche bevorzugt bei Transfektionsexperimenten von rekombinanten Plasmiden verwendet werden. Bei dieser Zelllinie handelte es sich um Nierenzellen ohne primäre Zilien.

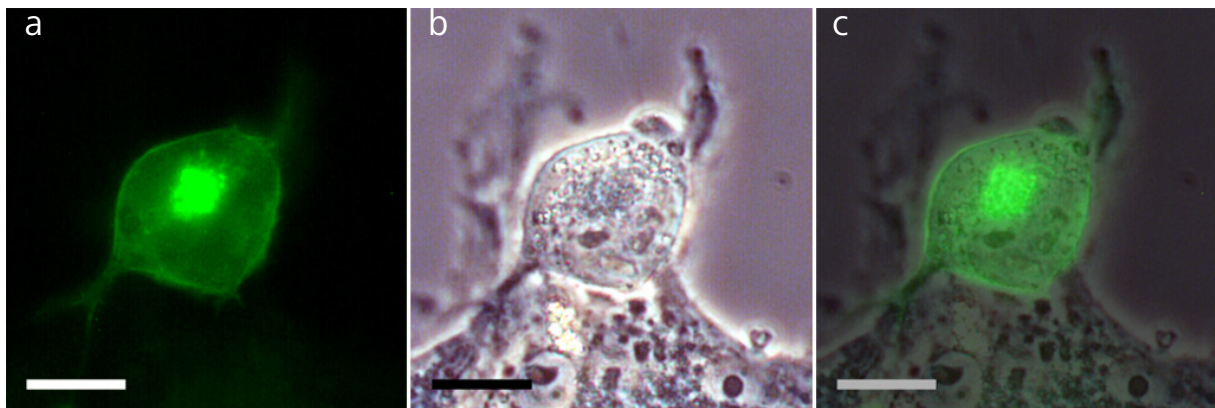
Hier konnte die Fragestellung des intrazellulären Proteintransports von Polycystin-2 durch den Golgi-Apparat aufgegriffen werden. Integrale Membranproteine können sowohl über den Golgi-Apparat (Cai et al., 2011; Farr et al., 2009; Rothman and Fine, 1980) als auch Golgi-unabhängig (Franz et al., 2007; Glebov et al., 2006; Jüschke et al., 2005; Morrow et al., 2002) vom endoplasmatischen Retikulum zur Zytoplasmamembran transportiert werden. Im Falle des integralen Membranproteins Polycystin-2 zeigten frühere institutseigene Experimente, dass unterschiedliche Varianten ein- und desselben Proteins auf unterschiedliche Weise zur somatischen Plasmamembran und primären Ziliem transportiert werden (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008). So konnte mithilfe von Endo H-Experimenten gezeigt werden, dass das PC2-Volllängen-Protein und dessen Triple-Alanin-Mutanten (PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA und PC2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA), welche nicht in der somatischen Plasmamembran, jedoch in der ziliären Plasmamembran lokalisiert sind, auf ihrem Weg vom endoplasmatischen Retikulum zur Ziliemembran nur bis zum cis-Golgi-Apparat gelangten. Vergleichbare Endo H-Experimente mit der in beiden Plasmamembran-Kompartimenten vorhandenen PC2 (1/703)-Deletionsmutante zeigten jedoch einen möglichen Transport des Proteins durch den Golgi-Apparat auf dem Weg zur somatischen Plasma- bzw. Ziliemembran (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008; Cedzich, 2000; Cai et al., 1999). Dies führte zu der Annahme, dass sich die Transportwege der unterschiedlichen Polycystin-2-Proteine vermutlich im cis-Golgi-Kompartiment trennen.

Für diese Fragestellung wurde die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie in Betracht gezogen, da eine höhere Auflösung im Elektronenmikroskop detailliertere Aussagen über die genaue Lokalisation des Proteins, v. a. in einem einzigen Zellorganell, in diesem Fall dem Golgi-Apparat, geben kann.

Wie bereits erwähnt, wurden dazu COS-7 Zellen transient mit unterschiedlichen PKD2-cDNA-Konstrukten transfiziert, die sowohl das für die Photokonversion notwendige Tetracystein-Motiv (TCM) als auch eine GFP-Sequenz beinhalteten.

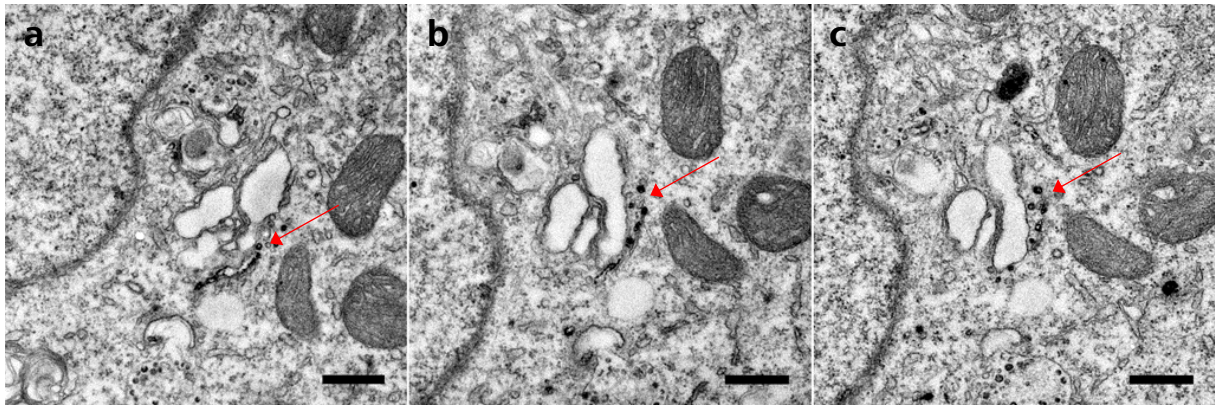
### 2.2.1 Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante

Zur Untersuchung der PC2-Deletionsmutante wurde das pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM-Konstrukt kloniert (s. II.1.5.1) und mittels der DEAE-Dextran-Methode transient in die COS-7-Zellen transfiziert (s. II.2.6.2) und die Zellen nahezu konfluent kultiviert. Nach einer parallelen immunzytochemischen Kontrolle auf primäre Zilien (vgl. Abb. 13) wurde zu den transfizierten Zellen das ReAsH-EDT<sub>2</sub>-Reagenz gegeben, welches gebunden an die im jeweiligen Protein enthaltene TC-Sequenz einen rot fluoreszierenden Komplex bildete. Die ebenfalls beobachtete GFP-Fluoreszenz einer ausgesuchten Zelle wurde detektiert (s. Abb. 15), die ReAsH-Fluoreszenz photokonvertiert und die Probe anschließend für die Transmissions-Elektronenmikroskopie präpariert (s. II.9).



**Abb. 15: Transient mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transfizierte COS-7-Zelle.** **a)** GFP-Fluoreszenz des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Retikulums und der Zytoplasmamembran. **b)** Durchlicht-Aufnahme der gleichen Zelle. **c)** Übereinandergelegte Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahmen. Hier ist sehr gut die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz im Bereich des Golgi-Apparates und an der somatischen Plasmamembran zu sehen. (Maßstab 20 µm)

Das Koordinatensystem am Schalenboden des Kulturgefäßes ermöglichte das Wiederfinden nach erfolgter Einbettung in das jeweilige Kunstharz (vgl. VI.1), sodass von ein- und derselben Zelle Ultradünnschnitte in Serie angefertigt und im Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet werden konnten (s. Abb. 16).



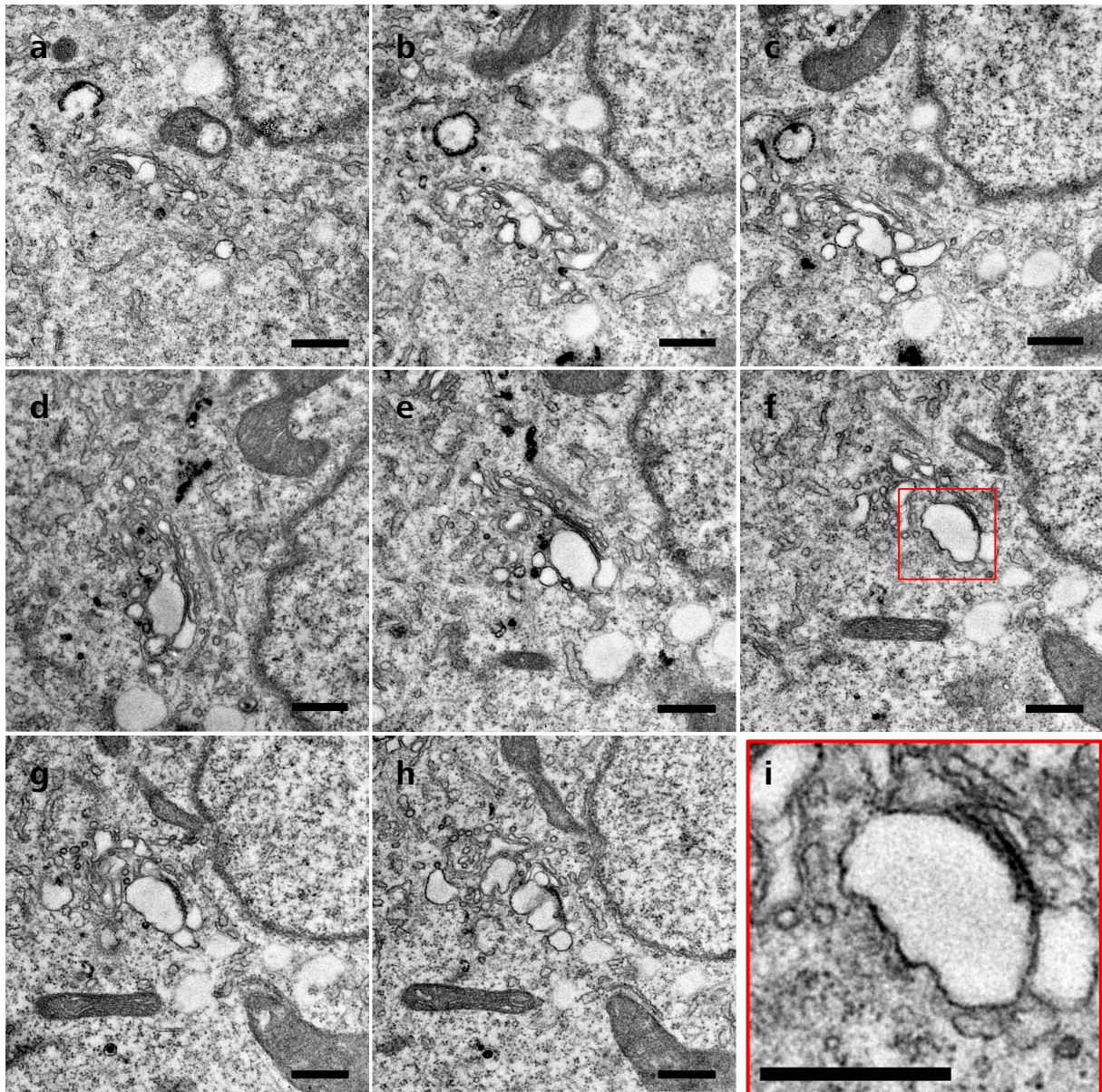
**Abb. 16: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Serienschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten COS-7-Zelle, welche transient mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transfiziert wurde.** Abb. 16 a – c zeigen deutlich den Verlauf des Golgi-Apparates und eine erfolgte Photokonversionsreaktion (kontrastreiche Strukturen) vereinzelt am cis-Golgi, aber v. a. zahlreiche kontrastierte Vesikel, über dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN; rote Pfeile). (Maßstab 500 nm)

In Abb. 16 a – c ist ein Golgi-Feld zu erkennen, welches linksseitig vom Zellkern und rechts von kontrastreichen Mitochondrien begrenzt wird. Die Schnittebene des Golgi-Apparates alleine zeigt zwar nicht eindeutig die cis- und trans-Seite des Golgi-Apparates, allerdings ist die Polarisierung des Golgi-Apparates bekannt. Auf der trans-Seite des Golgis befinden sich kontrastreiche Vesikel, welche bereits vom TGN abgeschnürt wurden. Diese Kontrastierung ist das Resultat der Photokonvertierung der ReAsH-Fluoreszenz, welche neben der GFP-Fluoreszenz vorhanden war (s. Abb. 15), und der anschließenden  $\text{OsO}_4$ -Behandlung des Photokonvertierungsproduktes.

(Membran-) Proteine werden vom endoplasmatischen Retikulum zur Modifizierung zum cis-Golgi-Apparat und von dort aus auf unterschiedlichen Wegen zum jeweiligen Bestimmungsort transportiert. Da es sich hier um eine transfizierte Zelle handelt, welche die PC2-Deletionsmutante PC2 (1/703), HA, TCM, eGFP exprimierte, und die Photokonversionsreaktion nur an Stellen stattfinden kann, an denen ReAsH an das Tetracystein-Motiv (TCM) gebunden vorliegt, zeigen die kontrastreichen vom TGN abgeschnürten Vesikel (indirekt) an, wo sich zum Zeitpunkt der Präparation die PC2-Deletionsmutante befand.

Ein weiteres Beispiel für den Golgi-Transport der deletierten PC2-Mutante ist in den Abb. 17 a – h zu sehen. Hier ist in acht aufeinanderfolgenden 50 nm-Serienschnitten der Verlauf eines Golgi-Feldes zu beobachten. Oberhalb des trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) sind wie in Abb. 16 a – c ebenfalls kontrastreiche Vesikel zu erkennen (Abb. 17 a – e), welche das Protein PC2 (1/703), HA, TCM, eGFP beinhalten. In den Abb. 17 e – h ist jedoch die cis-Seite des Golgi-Apparates ebenfalls stärker kontrastiert. Der vergrößerte Bereich in Abb. 17i zeigt eine kontrastierte Markierung eines Golgi-Säckchens, welches in der Mitte des Golgi-Feldes liegt.



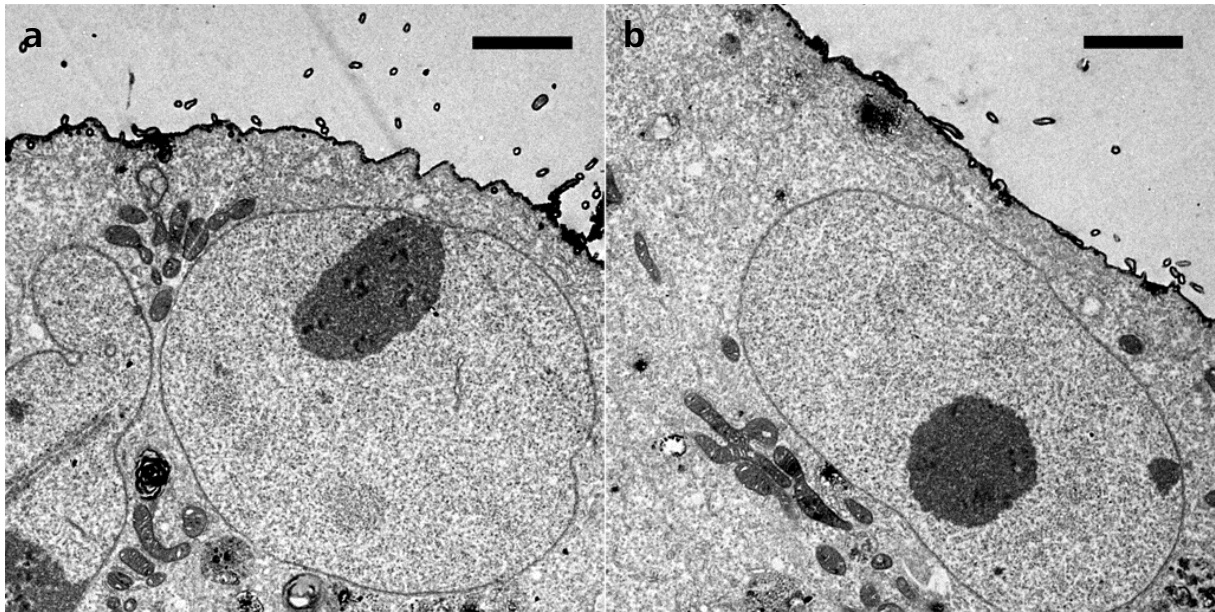


**Abb. 17:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Serienschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten COS-7-Zelle, welche transient mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transfiziert wurde. **a – h)** Verlauf des Golgi-Apparates; am cis-Golgi, aber auch am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) sind infolge der erfolgreichen Photokonversionsreaktion z. T. sehr kontrastreiche Strukturen zu sehen. **i)** Vergrößerung des rot markierten Ausschnittes aus Abb. 17f: photo-konvertierte Markierung eines Golgi-Säckchens in der Mitte des Golgi-Apparates. (Maßstab 500 nm)

Die TEM-Aufnahmen zeigen, dass die (1/703)-Deletionsmutante des integralen Membranproteins Polycystin-2 vom endoplasmatischen Retikulum zum cis-Golgi transloziert wird und dann den Golgi-Apparat (zur Modifizierung) durchquert, wonach sie am trans-Golgi-Netzwerk in Vesikel eingepackt wird und diese nach Abschnürung weiter zum jeweiligen Bestimmungsort, z. B. der Zytoplasmamembran transportiert werden.

In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (s. Abb. 15) ist zu erkennen, dass neben dem Golgi-Apparat zugleich die Zytoplasmamembran markiert ist; dies zeigt, dass in diesem Fall die deletierte

PC2 (1/703)-Mutante auch an der Zytoplasmamembran lokalisiert ist; was auch in TEM-Aufnahmen nach der ReAsH-DAB-Photokonvertierung deutlich wird (s. Abb. 18).



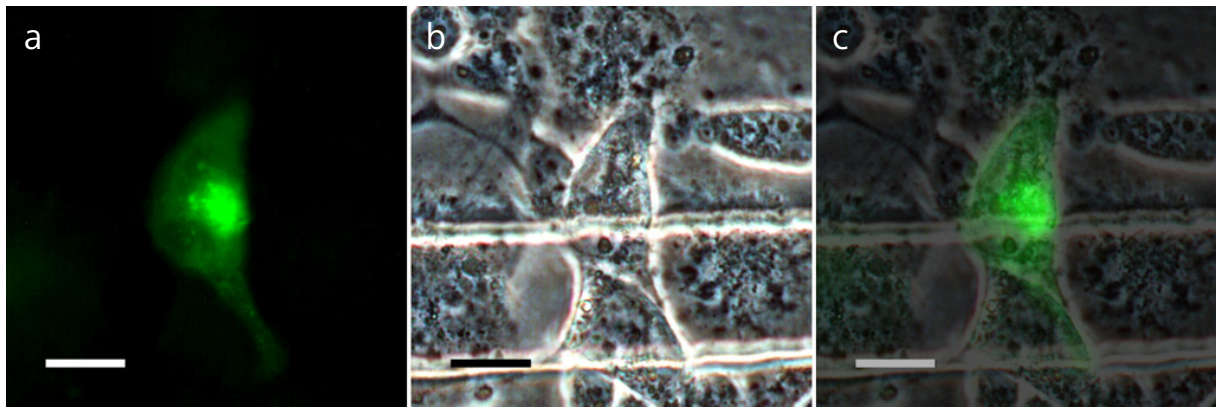
**Abb. 18:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Ultradünnschnitten von ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten COS-7-Zellen, welche transient mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transfiziert wurden. Die kontrastreiche Markierung der Zytoplasmamembranen zeigt jeweils die erfolgte Photokonversions-Reaktion. (Maßstab 2,5 µm).

In beiden Abbildungen 18 a und b sind neben ausgeprägten Zellkernen Teile der Zytoplasmamembran zu sehen, welche im direkten Vergleich mit großen Teilen des Zytoplasma und des Zellkerns sehr kontrastreich erscheinen. Eine Schwarzfärbung der ebenfalls kontrastreicherer Mitochondrien ist auf eine Autoxidation in diesen Organellen bei der Photokonvertierungsreaktion zurückzuführen.

### 2.2.2 Polycystin-2-Triple-Alanin-Mutanten

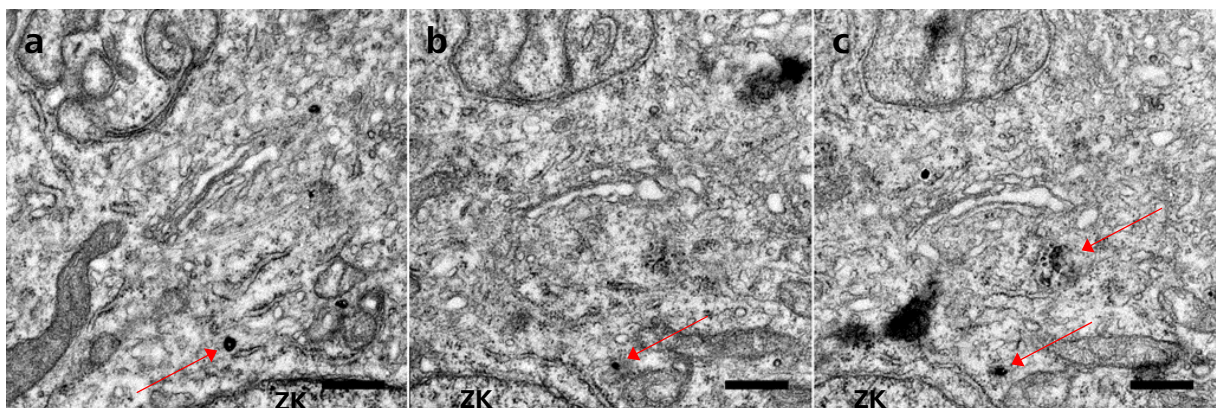
Für die Untersuchung des Proteintransports der PC2-Triple-Alanin-Mutanten wurden zwei cDNA-Konstrukte (pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM und pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM) kloniert (s. II.1.5.1) und mittels der DEAE-Dextran-Methode in COS-7-Zellen transient transfiziert (s. II.2.6.2). Nach einer parallelen immunzytochemischen Kontrolle auf primäre Zilien (vgl. Abb. 13) wurde zu den jeweilig transfizierten Zellen das ReAsH-EDT<sub>2</sub>-Reagenz gegeben, welches gebunden an die im jeweiligen Protein enthaltene Tetracystein-Sequenz einen rot fluoreszierenden Komplex bildete. Die ebenfalls beobachtete GFP-Fluoreszenz einer ausgesuchten Zelle wurde detektiert (s. Abb. 19), die ReAsH-Fluoreszenz photokonvertiert und die Probe anschließend für die Transmissions-Elektronenmikroskopie präpariert (s. II.9).





**Abb. 19: COS-7-Zelle, welche transient mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM transfiziert wurde. a)** Intrazelluläre GFP-Fluoreszenz im Bereich des Golgi-Apparates. **b)** Durchlicht-Aufnahme der gleichen Zelle. **c)** Übereinandergelagerte Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahmen. Die Fluoreszenz erscheint in und um den Golgi-Apparat lokalisiert. Es ist jedoch keine Markierung der Zytoplasmamembran zu erkennen. (Maßstab 20 µm)

Auch hier war das im Boden des Kulturgefäßes eingebrachte Koordinatensystem beim Wiederfinden nach erfolgter Einbettung in das jeweilige Kunstharz behilflich (vgl. VI.1), sodass von ein- und derselben Zelle 50 nm-Ultradünnschnitte in Serie angefertigt und im Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet werden konnten (s. Abb. 20).

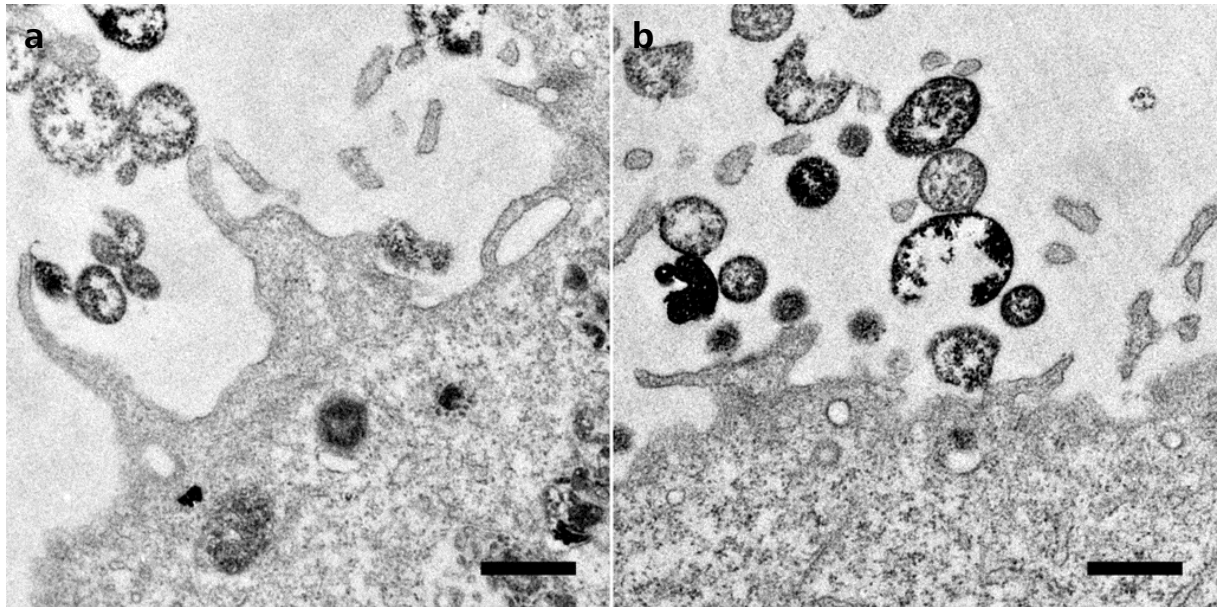


**Abb. 20: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Serienschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und Durcupan eingebetteten COS-7-Zelle, welche mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM transient transfiziert wurde. a-c)** Der Verlauf eines Golgi-Apparates ist anhand der Zisternen-Stapel gut zu erkennen. In den cis-Golgi-Bereichen und am endoplasmatischen Retikulum sind vereinzelt stark kontrastierte Vesikel zu sehen (rote Pfeile) (ZK = Zellkern; Maßstab 500 nm)

Die Abb. 20 a – c zeigen ein quer zur Bildfläche verlaufendes Golgi-Feld; am unteren Bildrand ist jeweils ein Teil des Zellkerns zu sehen. Im Vergleich zu den Abb. 16 und 17 sind keine derart kontrastierten Vesikel über dem TGN und/oder markierte Golgi-Zisternen zu sehen. Vereinzelt können im cis-Bereich des Golgi-Apparates und auch am endoplasmatischen Retikulum kontrastierte

Vesikel (Abb. 20 a – c: rote Pfeile) beobachtet werden. Die größeren schwarzen Flecken in Abb. 20 b und c stellen Artefakte dar, welche vermutlich durch die Behandlung mit  $\text{OsO}_4$  entstanden sind.

Bei Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (s. Abb. 19) war keine Markierung der Zytoplasmamembran zu erkennen. Die Triple-Alanin-Mutanten sind nicht in der Zytoplasmamembran lokalisiert, was durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der photokonvertierten Zelle (s. Abb. 21) bestätigt werden konnte.



**Abb. 21:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Ultradünnschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten COS-7-Zelle, welche mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703) (KFI→AAA) (575-577 AS), HA, TCM transient transfiziert wurde. Es ist keine Kontrastierung an der Zytoplasmamembran zu erkennen. Die kontrastreichen extra- und intrazellulären vesikulären Strukturen zeigen jedoch, dass eine Photokonvertierungs-Reaktion an der Zelle stattgefunden hat. (Maßstab 500 nm)

Obwohl nach einer ReAsH-Färbung und Photokonvertierung keine Kontrastierung an der Zytoplasmamembran zu sehen war, zeigen die kontrastreichen Vesikel ausserhalb der Zelle und die Schwärzungen der vesikulären Strukturen jedoch an, dass an dieser Zelle eine Photokonvertierung stattgefunden hatte.

Für die zweite Triple-Alanin-Mutante PC2 (1/703) (KLF→AAA) (572-574 AS), HA, TCM, eGFP ergaben sich vergleichbare fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen (nicht gezeigt; vgl. Abb. 18 – 21). Auch bei der KLF-Mutante war der Bereich des Golgi-Apparates, bzw. des endoplasmatischen Retikulums, im Gegensatz zur Zytoplasmamembran fluoreszenzmarkiert. Die TEM-Aufnahmen nach ReAsH-Färbung, Photokonvertierung und TEM-Präparation zeigten jedoch ebenfalls keine Markierung des gesamten Golgi-Apparates, sondern nur im cis-Golgi-Bereich und

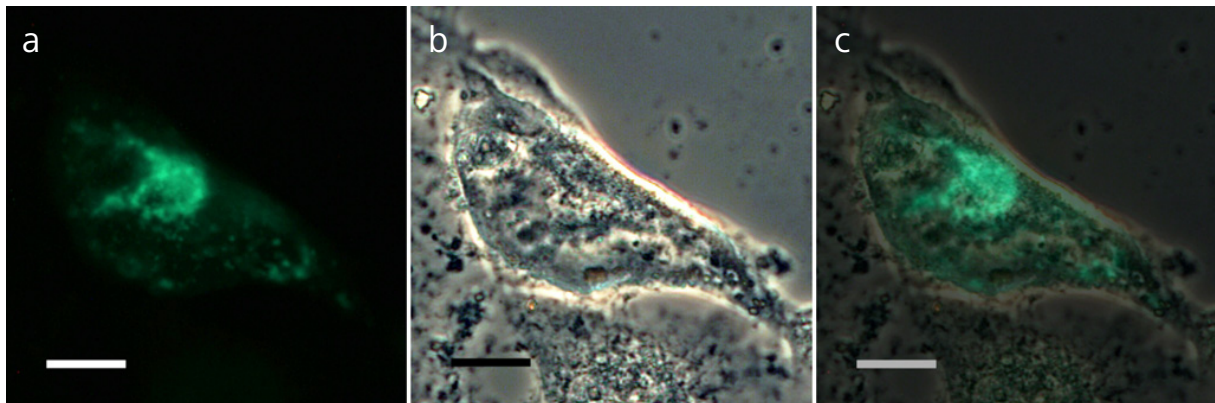


am endoplasmatischen Retikulum, und es war auch keine Kontrastierung an der somatischen Plasmamembran zu beobachten.

### 2.2.3 Volllängen-Polycystin-2

Zur Untersuchung des Proteintransports des Volllängen-Proteins von Polycystin-2 mittels der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie wurden LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen transient mit einem pcDNA3/PKD2, eGFP, TCM (N), HA-cDNA-Konstrukt transfiziert. Diese Versuche wurden zu einem späteren Zeitpunkt als die oben beschriebenen durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden sowohl das Lipofectamine™ 2000-Transfektionsprotokoll an LtTA-2,22- und LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen optimiert (s. Protokoll II.2.6.2) als auch mehrere cDNA-Konstrukte für das Volllängen-Protein von Polycystin-2 getestet. Dabei wurde v. a. die GFP-DNA an unterschiedlichen Positionen im cDNA-Konstrukt positioniert, um die Auswirkungen auf den Proteintransport ins primäre Zilium zu testen. Die folgenden fluoreszenzmikroskopischen und TEM-Aufnahmen entstanden im Zuge der Untersuchung des Zilien-transportes von Polycystin-2 (s. III.2.3).

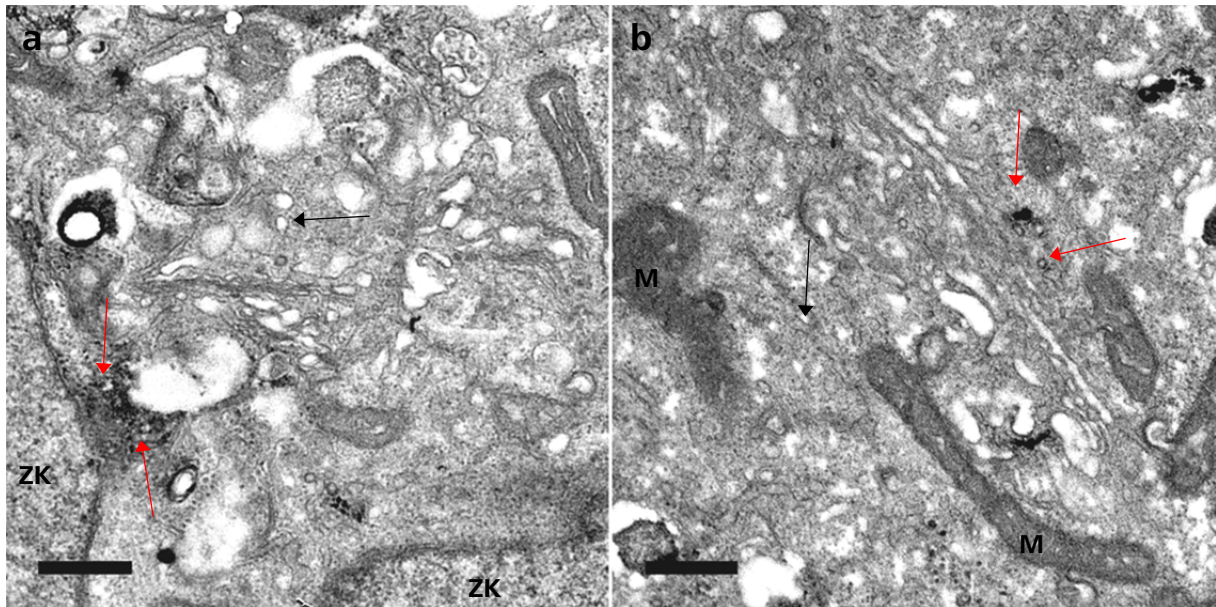
In den Abb. 22 a – c ist eine mit dem genannten Volllängen-PC2-cDNA-Konstrukt transient transfizierte Zelle zu sehen. Das GFP wurde hierfür in den NH<sub>2</sub>-Terminus von Polycystin-2 (s. II.1.5.1) inkloniert. Die ausgesuchte GFP-Fluoreszenz wurde hierfür auf der Fokusebene des Zellkörpers detektiert, die parallel beobachtete ReAsH-Fluoreszenz photokonvertiert und die Probe anschließend für die Transmissions-Elektronenmikroskopie präpariert (s. II.9).



**Abb. 22: LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle, welche mit pcDNA3/PKD2, eGFP, TCM (N), HA transient transfiziert wurde.**  
**a)** Punktuelle GFP-Fluoreszenz um den Golgi-Apparat. **b)** Durchlicht-Aufnahme der gleichen Zelle. **c)** Überlappende Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahmen. Die Zytoplasmamembran ist nicht fluoreszenzmarkiert. (Maßstab 20  $\mu$ m)

Zur Wiederfindung der photokonvertierten Zelle wurde erneut das Koordinatensystem am Schalenboden des Kulturgefäßes verwendet (vgl. VI.1), sodass von ein- und derselben Zelle Ultradünnschnitte angefertigt und im Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet werden konnten. Die

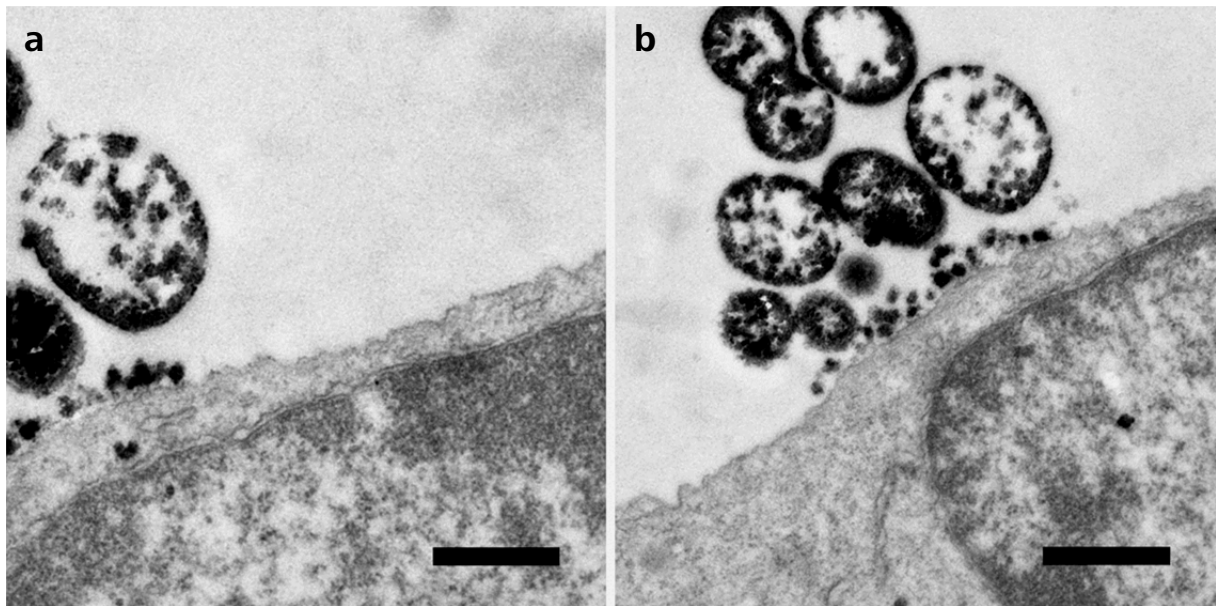
folgenden Aufnahmen (Abb. 23 a und b) zeigen unterschiedliche Schnittebenen von Golgi-Apparaten in der photokonvertierten Zelle, d. h. sie sind nicht in Serie aufgenommen.



**Abb. 23: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Ultradünnschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle, welche mit pcDNA3/PKD2, eGFP, TCM (N), HA transient transfiziert wurde. a) Ein in der Mitte liegendes Golgi-Feld wird auf der linken Seite vom Zellkern begrenzt. Dazwischen sind kontrastreiche vesikuläre Strukturen zu erkennen, die sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch am Golgi-Apparat lokalisiert sind (rote Pfeile). b) Vereinzelt kontrastierte vesikuläre Strukturen (rote Pfeile) deuten auf den Golgi-Apparat auf der rechten Seite der Abbildung hin. Die Vesikel, die sich auf der linken Seite vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) abschnüren, sind nicht markiert (schwarze Pfeile). (ZK = Zellkern; M = Mitochondrium; Maßstab 500 nm)**

In Abb. 23a ist in der Mitte der TEM-Aufnahme ein Golgi-Feld zu erkennen. Dieses wird linksseitig vom Zellkern (ZK) begrenzt. Zwischen dem Zellkern, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat sind kontrastreiche vesikuläre Strukturen zu sehen. Allerdings kann auch bei höheren Vergrößerungen keine Photokonvertierungsreaktion in der Mitte des Golgi-Apparates und im trans-Golgi-Netzwerk beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Kontrastierung der in beiden Abbildungen zu sehenden Mitochondrien ist durch eine Autoxidations-Reaktion bei der Photokonvertierung entstanden.

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit pcDNA3/PKD2, eGFP, TCM (N), HA transient transfizierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle zeigt wiederum keine Markierung an der Zytoplasmamembran, was erneut durch die TEM-Aufnahmen der photokonvertierten Zelle (s. Abb. 24) belegt werden konnte.



**Abb. 24: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Ultradünnschnitten von ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten transient transfizierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen, welche mit pcDNA3/PKD2, eGFP, TCM (N), HA transient transfiziert wurden.** Es ist keine Kontrastierung an der Zytoplasmamembran zu erkennen. Die kontrastreichen Vesikel auf der Außenseite der Zellen zeigen jedoch, dass eine Photokonvertierungs-Reaktion an den Zellen stattgefunden hat. (Maßstab 500 nm)

Bei beiden Zellen in Abb. 24 sind Ausschnitte der Zytoplasmamembran der photokonvertierten Zelle zu sehen. Die kontrastierten vesikulären Strukturen ausserhalb der Zelle weisen auf eine stattgefundene Oxidationsreaktion hin. Die somatische Plasmamembran wurde davon wie erwartet nicht betroffen und war folglich nicht kontrastiert.

Durch die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie konnte somit auch bei höheren Vergrößerungen durch transmissionselektronische Aufnahmen gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Polycystin-2-Proteinvarianten voneinander abweichende Transportwege vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort nehmen. Bei der PC2 (1/703)-Deletionsmutante wurde gezeigt, dass ein Transport dieses Proteins durch den gesamten Golgi-Apparat stattfindet (vgl. III.2.2.1 Abb. 16 und 17) und dass dieses ebenfalls, wie bereits hinreichend bekannt war, an der somatischen Plasmamembran lokalisiert ist (vgl. Abb. 18). Im Gegensatz dazu wurden das Polycystin-2-Volllängen-Protein und die beiden Triple-Alanin-Mutanten ausschließlich nur bis zum cis-Golgi transloziert (vgl. Abb. 20 und 23). Es konnten weder Hinweise dafür erhalten werden, dass ein Transport durch den Golgi-Apparat stattfindet, noch waren diese Proteine in der somatischen Plasmamembran lokalisiert (vgl. Abb. 21 und 24).

## 2.3 Zilien-Transport

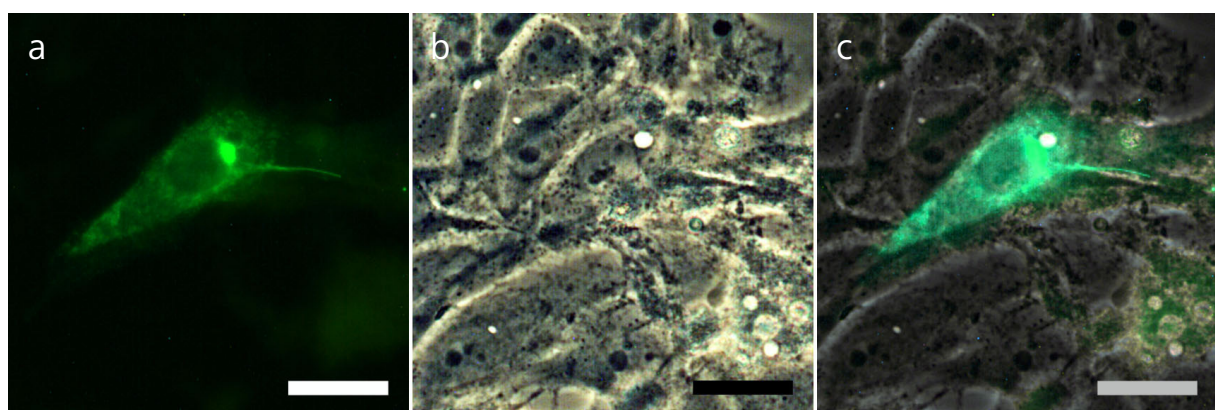
Ein weiteres Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des primären Ziliums. In diesem Kapitel wurde versucht, mittels der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie Hinweise über den Proteintransport von Polycystin-2 zum und im primären Zilium zu gewinnen.

Dazu wurden, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, diverse Nieren-Zelllinien transient mit verschiedenen PKD2-cDNA-Konstrukten transfiziert.

### 2.3.1 Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante

Wie bereits erwähnt, konnte in zahlreichen (institutseigenen) Veröffentlichungen gezeigt werden, dass die PC2 (1/703)-Deletionsmutante im primären Zilium lokalisiert ist (s. I.1.2.1). Die bisherigen Kenntnisse beruhten v. a. auf fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Mit Anwendung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie sollte unter Betrachtung der Strukturen bei höherer Auflösung im Elektronenmikroskop Aufschluß über die genaue Lokalisation und auch über den Transport des Proteins ins Zilium gewonnen werden.

Nach transients Transfektion von LLC-PK<sub>1</sub>-Nierenepithelzellen mit dem pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM-cDNA-Konstrukt wurden die Zellen nahezu 100% konfluent kultiviert und über die GFP-Fluoreszenz die Ausbildung von primären Zilien überprüft. Die verkürzte PC2-Mutante gelangt selbst mit dem GFP ins primäre Zilium. Nach der *in vivo*-ReAsH-Färbung (s. II.9.3) wurde eine Zelle mit einem grün leuchtenden primären Zilium detektiert und die parallel beobachtete ReAsH-Fluoreszenz für eine Photokonvertierung eingesetzt (s. II.9.4).

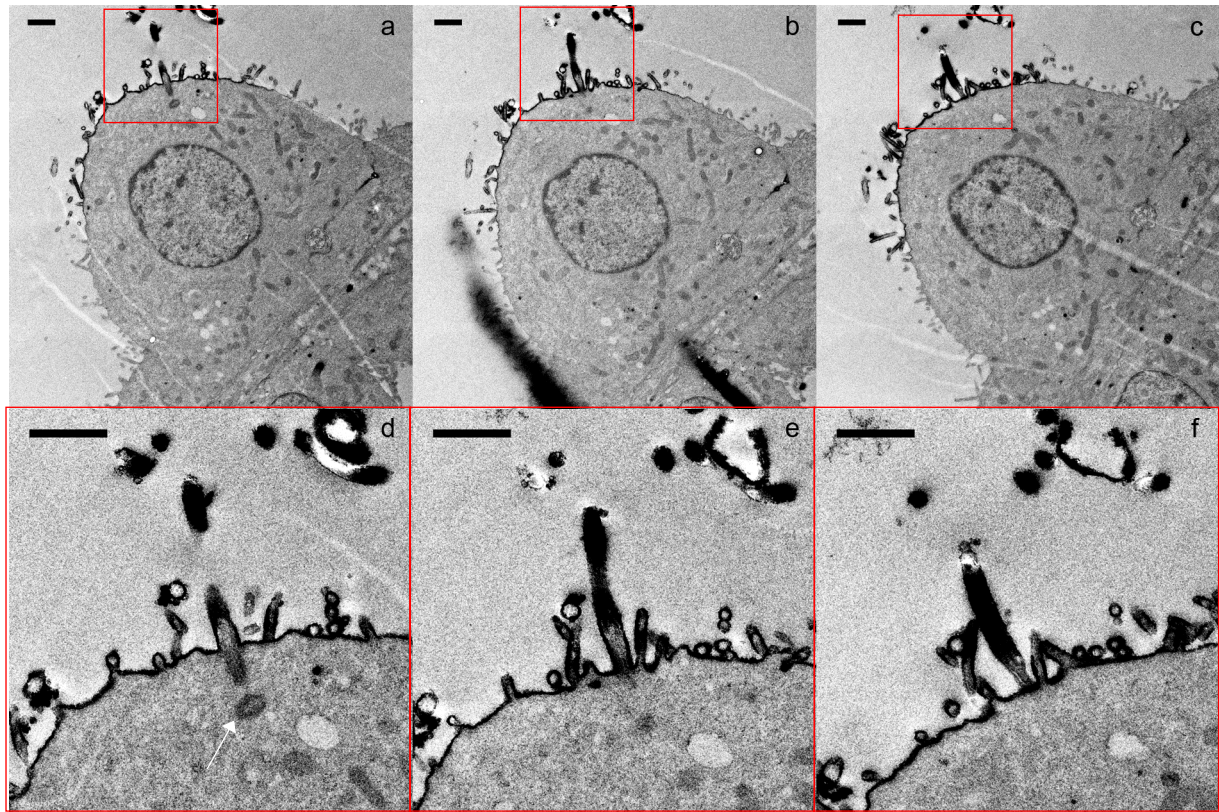


**Abb. 25: LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle, welche mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transient transfiziert wurde.**

**a)** GFP-Fluoreszenz im Bereich des Golgi-Apparates und des aus der Bildebene herausragenden primären Ziliums. **b)** Durchlicht-Aufnahme der gleichen Zelle. **c)** Übereinandergelegte Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahmen. Hier ist ebenfalls die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz im Bereich des Golgi-Apparates und im primären Zilium zu sehen. (Maßstab 20 µm)



Das Koordinatensystem am Schalenboden des Kulturgefäßes ermöglichte das Wiederfinden nach erfolgter Einbettung in das jeweilige Kunstharz (vgl. VI.1), so dass von ein- und derselben Zelle Ultradünnschnitte in Serie angefertigt und im Transmissions-Elektronenmikroskop betrachtet werden konnten.

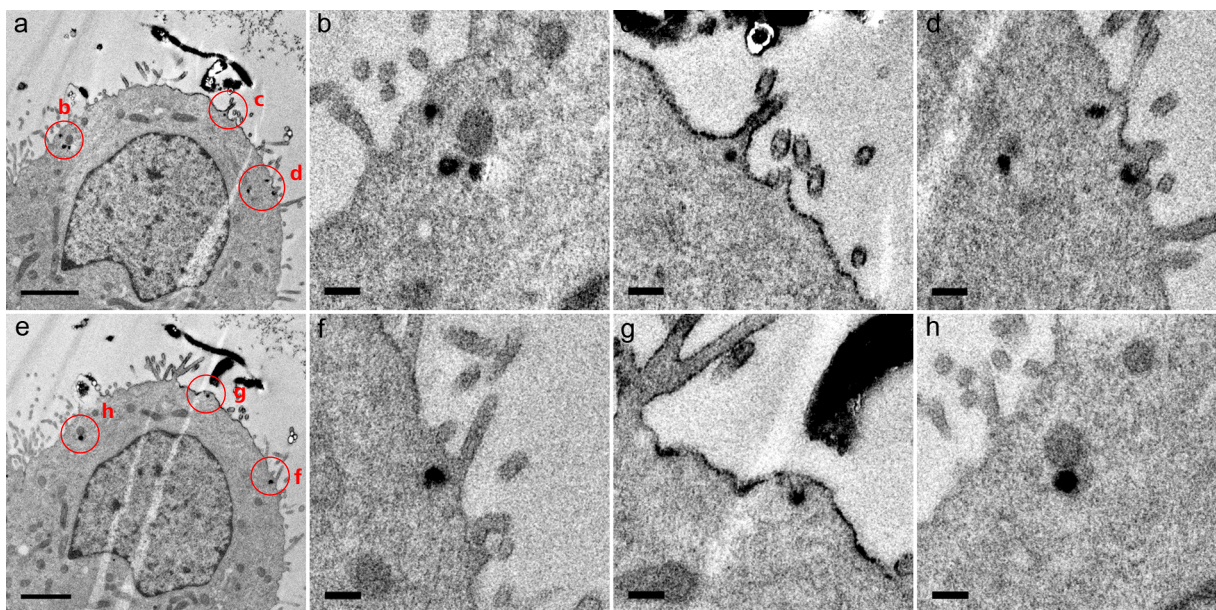


**Abb. 26: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Serienschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle, welche mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transient transfiziert wurde. a-c) Verlauf des primären Ziliums und eine erfolgte Photokonvertierungs-Reaktion am primären Zilium und an der somatischen Plasmamembran. d-e) Vergrößerte Darstellungen der photokonvertierten Markierung des primären Ziliums und der somatischen Plasmamembran aus Abb. a – c (rote Markierungen). (Maßstab 1 µm)**

Die Abb. 26 a – c zeigen Übersichtsaufnahmen von drei 50 nm-Serienschnitten einer ReAsH-gefärbten und photokonvertierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle, die mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transient transfiziert wurde. In der Mitte der Abbildungen ist jeweils der kreisrunde Zellkern zu sehen; die basale Seite der Zelle befindet sich auf der rechten Seite. Bereits in den Übersichtsaufnahmen ist die Kontrastierung an Teilen der apikalen Zytoplasmamembran zu erkennen (vgl. Abb. 18). Die roten Markierungen kennzeichnen das, auf der Oberfläche der Zelle ausgebildete, primäre Zilium, welches ebenfalls einen starken Kontrast aufweist. Betrachtet man diese Bereiche bei höheren Vergrößerungen (Abb. 26 d – f), kann man den Verlauf der Kontrastierung im primären Zilium nachverfolgen. In Abb. 26d liegt das Basalkörperchen mit seinem Tochterzentriol (weißer Pfeil) in der Schnittebene. Die Schwarzfärbung der somatischen Plasmamembran geht in die ziliäre Plasma-

membran über. Der Schaft des primären Ziliums liegt in mehreren Schnittebenen und ist daher in Abb. 26d nicht kontinuierlich dargestellt. Der untere Teil ist ab der Hälfte und das obere Stück intensiv geschwärzt. In Abb. 26e ist das Übergangsstück der zuvor getrennten Schaftteile zu sehen, welches ebenfalls stark kontrastiert ist. Das gleiche Bild zeigt sich auch in der darauffolgenden Schnittebene in Abb. 26f. Einige der außerhalb der Zelle liegenden schwarzen Partikel sind vermutlich weitere Anschnitte des in Zellkultur über 20 µm lang werdenden primären Ziliums (s. I.2.1), welches durch seine geschwungene Form nur teilweise angeschnitten wurde.

Weitere Aufnahmen dieser photokonvertierten Zelle (s. Abb. 27) zeigten zwei Schnittebenen der Zelle, in denen der kontrastierte Schaft des primären Ziliums über der Zelle lag. Die beiden Abb. 27 a und e sind wiederum Übersichtsaufnahmen von der ganzen Zelle in aufeinanderfolgenden Schnittebenen. Die Aufnahmen 27 b – d und f – h zeigen vergrößerte Darstellungen der in den Übersichtsaufnahmen rot eingekreisten Strukturen. Unterhalb der Zytoplasmamembran befinden sich an mehreren Stellen stark kontrastierte, rund erscheinende Partikel, möglicherweise Vesikel, in denen aller Wahrscheinlichkeit nach die deletierte PC2-Mutante zur Zytoplasmamembran transportiert wird. In den Abb. 27 c und g sind photokonvertierte Bereiche der Zytoplasmamembran zu sehen, in denen das Protein möglicherweise bereits in diese eingebaut wurde.



**Abb. 27: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 50 nm-Ultradünnschnitten einer ReAsH-gefärbten, photokonvertierten und in Durcupan eingebetteten LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle, welche mit pEGFP-N1/PKD2 (1/703), HA, TCM transient transfiziert wurde. a und e) Übersicht über die Zelle mit einem darüberliegenden photokonvertierten Bereich des primären Ziliums. In den Abb. b – c und f – h) sind die in den Übersichten gekennzeichneten Bereiche (rote Kreise) bei höheren Vergrößerungen gezeigt. (Maßstab: a & e: 1 µm; b-d & f-h: 250 nm)**



### 3 Morphologische Charakterisierung des primären Ziliums

Der zweite Aspekt dieser Arbeit konzentrierte sich auf die morphologische Charakterisierung des primären Ziliums und die Ultrastruktur des basalen Bereichs. Das Ziel war u. a., weitere Hinweise auf den Proteintransport von (integralen Membran-) Proteinen zum und im primären Zilium zu erhalten. Zahlreiche Publikationen beschreiben die Lokalisation von Membranproteinen sowohl in der somatischen als auch ziliären Plasmamembran. Für den Transport dieser membranständigen Proteine gibt es allerdings bis dato nur Hypothesen (Nachury et al., 2010; Emmer et al., 2010; s. I.3.2). Erste Untersuchungen zur Ultrastruktur und z. T. auch zur Funktion des primären Ziliums wurden zwar schon vor längerer Zeit durchgeführt (Anderson 1972; Sorokin, 1962), jedoch ist es bisher nicht gelungen, den Bestandteilen des Ziliums distinkte Funktionen zuzuordnen (Seeley and Nachury, 2010).

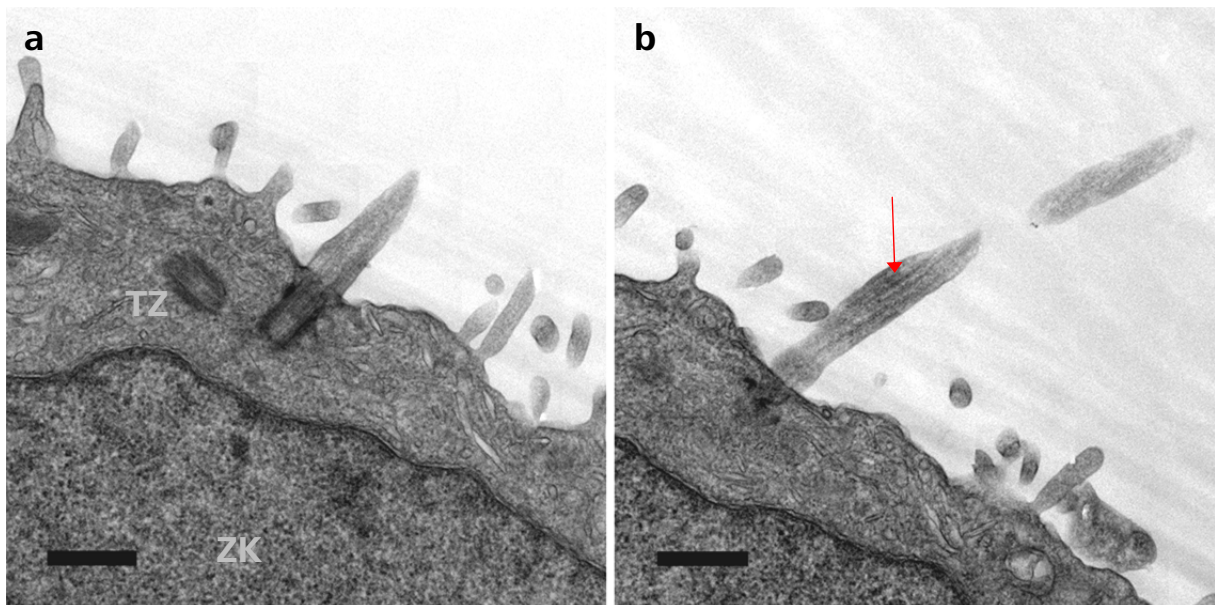
Um bei der Präparation der verwendeten Nierenepithelzellen (LLC-PK<sub>1</sub>) eine möglichst naturgetreue und physiologisch definierte Strukturhaltung zu gewährleisten, wurde die Hochdruckgefrier-Methode zur Kryo-Immobilisierung für die angewandten Zellsysteme etabliert (s. II.4.2). Die Zellen wurden auf dafür geeigneten Saphirplättchen nahezu 100% konfluent kultiviert und darauf in der Hochdruck-Gefrier-Anlage EM PACT 2 (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar) innerhalb von Sekundenbruchteilen (~50 ms) mit flüssigem Stickstoff fixiert. Die Etablierung und Optimierung dieser Methode erwies sich im Laufe dieser Arbeit als zeitaufwendig, da sich die untersuchten Zelllinien unterschiedlich verhalten und die jeweiligen Präparationsmethoden darauf abgestimmt und optimiert werden mussten. Nachdem diverse Probenhalter (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar; s. II.4.2.3), in denen das bewachsene Saphirplättchen in die EM PACT 2 transferiert wurde, getestet wurden, stellte sich heraus, dass sich dieses im System der Anlage noch frei bewegen konnte und es dabei stets zu ultrastrukturell zwar teilweise gut erhaltenen, aber jeweils abgeflachten, zusammengepressten Zellstrukturen kam (TEM-Aufnahmen nicht gezeigt). Zur Abhilfe wurden eigens angefertigte Abstandshalter (Physik-Werkstatt, Universität Regensburg) verwendet, um die Saphirplättchen in den dafür vorgesehenen Probenhaltern (s. II.4.2.3) zu stabilisieren. Am besten geeignet waren die 100 µm und 200 µm tiefen Flachpräparatehalter, in denen das 50 µm dicke Saphirplättchen jeweils mit einem 50 µm bzw. 150 µm dicken Platzhalter (s. II.4.2.3) so fixiert wurde, dass es sich während des Hochdruckgefriervorgangs nicht mehr bewegen konnte. Die vitrifizierten Zellen wurden anschließend in die automatische Gefriersubstitutionsanlage EM AFS 2 (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar) transferiert. Während der Gefriersubstitution wurde in einem vorprogrammierten Temperatur- und Zeitschema (s. II.4.2.4) das intrazelluläre Wasser durch die Substitutionslösung (s. II.4.2.4) ersetzt; gleichzeitig werden dabei die Biomoleküle chemisch schonend fixiert und kontrastiert. Die weitere Probenpräparation zur Einbettung der Proben in das jeweilige Kunstharz erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Kontrolle wurden stets sowohl ein immunzytochemischer Nachweis auf primäre Zilien (s. II.2.6.5; vgl. Abb. 13) als auch eine chemisch fixierte und konventionell bei Raumtemperatur entwässerte und eingebettete Probe (s. II.4.1; s. III.3.1) mitgeführt.

### 3.1 Darstellung der Basis von primären Zilien nach chemischer Fixierung

Bei der konventionellen Probenpräparation wurden die Zellen in den sog.  $\mu$ -Dishes (35 mm; ibidi GmbH, München) nahezu 100% konfluent kultiviert und mit Glutaraldehyd chemisch fixiert (s. II.4.1.2). Anschließend wurden die Zellen mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat zur Nachfixierung und Kontrastierung behandelt und mittels einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert (s. II.4.1.3 - 4.1.4). Für die Ultramikrotomie wurden die Zellen in ein entsprechendes Kunstharz eingebettet (s. II.4.1.5) und eine ausgesuchte Position dafür präpariert (s. II.4.3). Für die Suche nach primären Zilien wurden 200 nm-Semidünnschnitte in Serie und in horizontaler Schnittebene relativ zur Aufwachsebene der Zellen angefertigt.

Die Abb. 28 zeigt zwei aufeinanderfolgende Schnittebenen eines primären Ziliums einer LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle. In Abb. 28a ist der basale Bereich des Ziliums längs geschnitten. Es ist sowohl das intrazellulär gelegene Basalkörperchen als auch der von der Zytoplasmamembran in das Zelläußere ragende Schaft des primären Ziliums getroffen. Neben dem Basalkörperchen ist das dazugehörige Tochterzentriol (TZ) zu sehen. Die zweite Schnittebene des primären Ziliums in Abb. 28b zeigt den elongierten Teil des Ziliumschaftes. Dabei ist zum Teil das aus Mikrotubuli-Paaren bestehende Axonem zu erkennen (roter Pfeil).



**Abb. 28: 200 nm-Semidünnschnitte von zwei aufeinanderfolgenden Schnittebenen eines primären Ziliums von chemisch fixierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen. a)** Basaler Bereich des primären Ziliums mit angeschnittenem Tochterzentriol (TZ). **b)** Aus der Zelle ragender Ziliumschaft mit erkennbarem Mikrotubuli-Axonem (roter Pfeil). (Maßstab 500 nm; ZK = Zellkern)

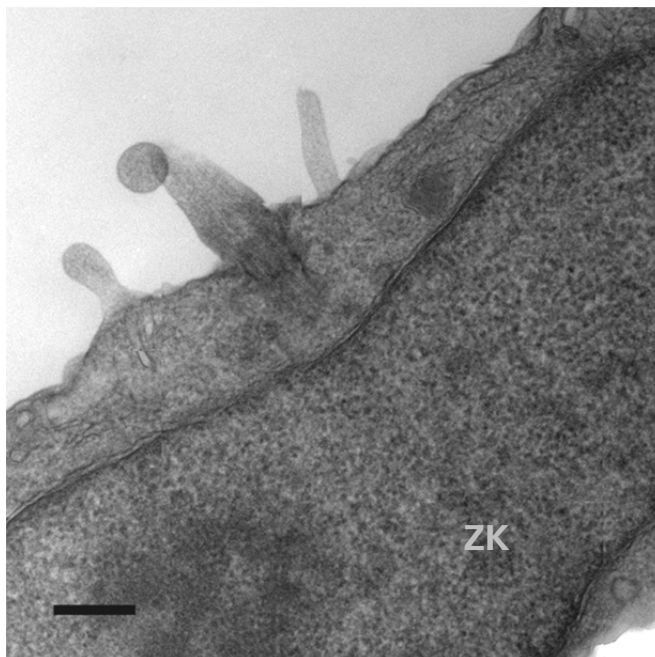


200 nm-Semidünnschnitte sind prinzipiell zu dick, um feine Strukturdetails unmittelbar darzustellen; sie sind aber sehr gut geeignet, mit Hilfe von Elektronen-Tomographie (mit 200 – 300 keV) die Ultrastruktur im Bereich der Zilienbasis aufzuklären.

### 3.1.1 TEM-Tomographie von konventionell präparierten Nierenepithelzellen

Um mehr Informationen aus den 200 µm Semidünnschnitten der konventionell präparierten Zellen mit ihren primären Zilien zu erhalten, wurden elektronen-tomographische Aufnahmen an einem 200 keV Transmissions-Elektronenmikroskop (Tecnai™; FEI Co., Eindhoven, NL) in der Abteilung für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung an der Medizinischen Universität in Wien (Prof. M. Pavelka) angefertigt. Abb. 29 zeigt einen 200 nm-Semidünnschnitt eines primären Ziliums von konventionell präparierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen.

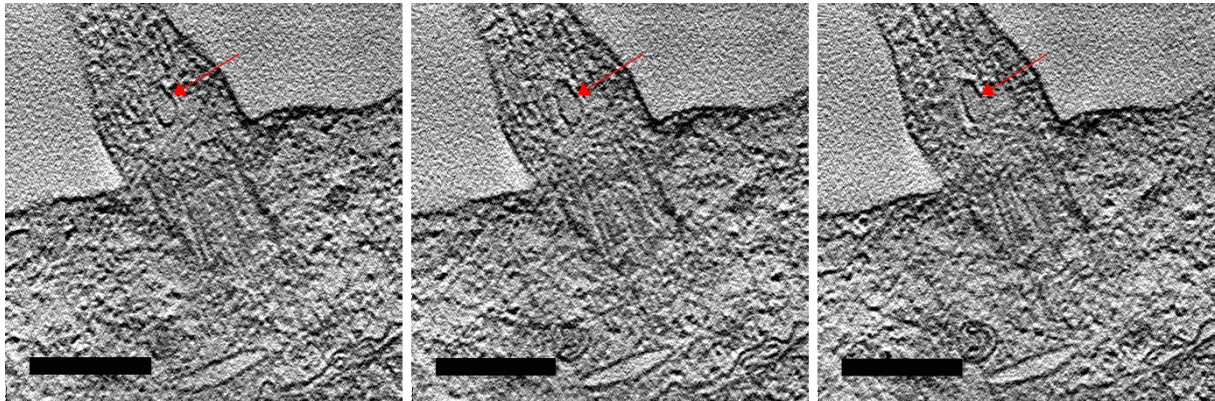
In der Abb. 29 sind der basale Teil und der Übergangsbereich in den Schaft eines primären Ziliums zu sehen. Die runde Struktur am Ziliumende ist ein in der Schnittebene über- bzw. unter dem Zili-um liegendes extrazelluläres Vesikel. Von dem in Abb. 29 gezeigten Teil des primären Ziliums wurden aus TEM-tomographischen Aufnahmen eine 3D-Rekonstruktion mittels IMOD erstellt (s. VI.3 Begleit-CD → Movie zu Abb. 29).



**Abb. 29: 200 nm Semidünnschnitt eines primären Ziliums einer konventionell präparierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle.** (Maßstab 300 nm; ZK = Zellkern)

In Abb. 30 sind drei horizontale 1 nm-Schnitte aus dem berechneten Tomogramm dargestellt, in einem Abstand von 10 nm. Hier ist im Anfangsbereich des Ziliumschaftes eine rundlich-elongierte Struktur, welche als Vesikel interpretiert werden kann, zu erkennen. Eine Doppelmembranstruktur ist bei höherer Vergrößerung (Aufnahme nicht gezeigt) lediglich zu erahnen. Diese Struktur zieht sich über 55 von 390 horizontalen Schnitten hin; sie hat folglich einen Durchmesser von ca. 55 nm

(55 Schnitte x Dicke in nm) und lässt sich daher aufgrund ihrer Form und Größe als ein Vesikel interpretieren.



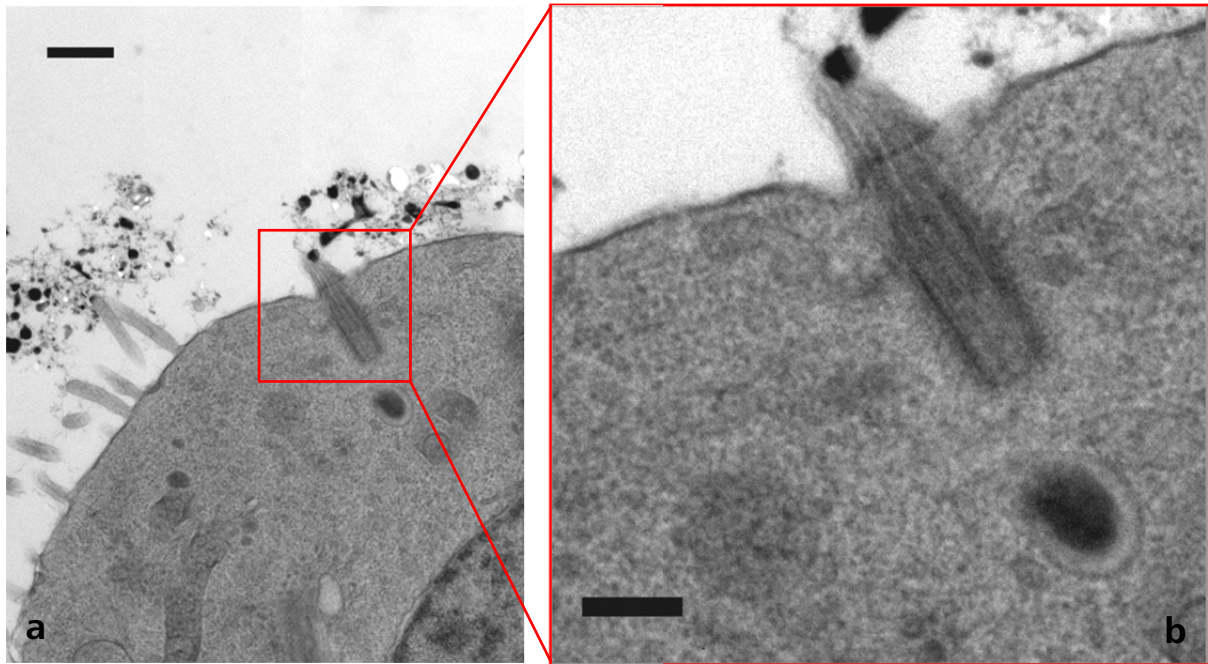
**Abb. 30: TEM-tomographische Schnitte aus einem berechneten Tomogramm.** In der Mitte des Axonems ist im Anfangsbereich des Ziliumschaftes eine vesikuläre Struktur zu erkennen (rote Pfeile). (Maßstab 300 nm)

Auf der Begleit-CD zu dieser Arbeit ist eine Filmdatei einer mittels IMOD errechneten 3D-Rekonstruktion zu finden (s. VI.3 Begleit-CD → Movie zu Abb. 29), bei der der Verlauf durch die Struktur eines primären Ziliums, welches nach konventioneller Präparation (s. II.4.1) EM-tomographisch aufgenommen wurde, zu erkennen ist. Mit dieser 3D-Rekonstruktion wurde keine 3D-Visualisierung mittels AMIRA® erstellt, da die Erhaltung des primären Ziliums aufgrund der chemischen Fixierung suboptimal ist und dadurch die vesikuläre Struktur im Inneren des primären Ziliums bzw. die Doppelmembran um diese Struktur lediglich zu erahnen ist. Aus diesem Grund wurden die Nierenepithel-Zellen für eine bessere Strukturhaltung mittels der Hochdruckgefrier-Methode und Gefriersubstitution präpariert (s. II.4.2).

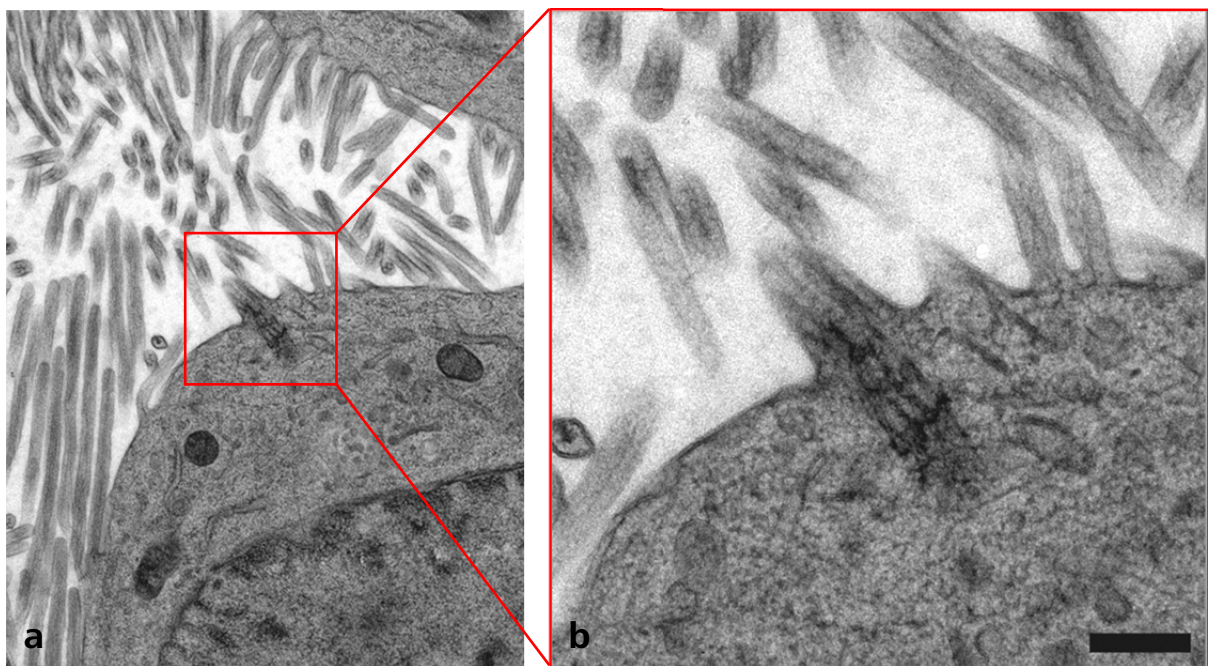
### **3.2 TEM-Untersuchungen von 200 nm-Semidünnschnitten von hochdruckgefrorenen, gefriersubstituierten Nierenepithelzellen**

Da aus den tomographischen Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen der chemisch fixierten und konventionell präparierten Proben unter den derzeit gegebenen Präparations- und Messmöglichkeiten keine neuen Erkenntnisse gezogen werden konnten, wurden die ultrastrukturell besser erhaltenen hochdruckgefrorenen und gefriersubstituierten Zellen TEM-tomographisch mit einem 200 keV Tecnai™ (FEI Co., Eindhoven, NL; Prof. M. Pavelka, Abteilung für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung, Medizinische Universität, Wien) analysiert.

Die folgenden Abb. 31 – 33 zeigen 200 nm-Semidünnschnitte von primären Zilien von LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen, welche mittels Hochdruckgefrieren kryo-immobilisiert und nach Gefriersubstitution bei Raumtemperatur in Kunststoff-Harz eingebettet wurden.

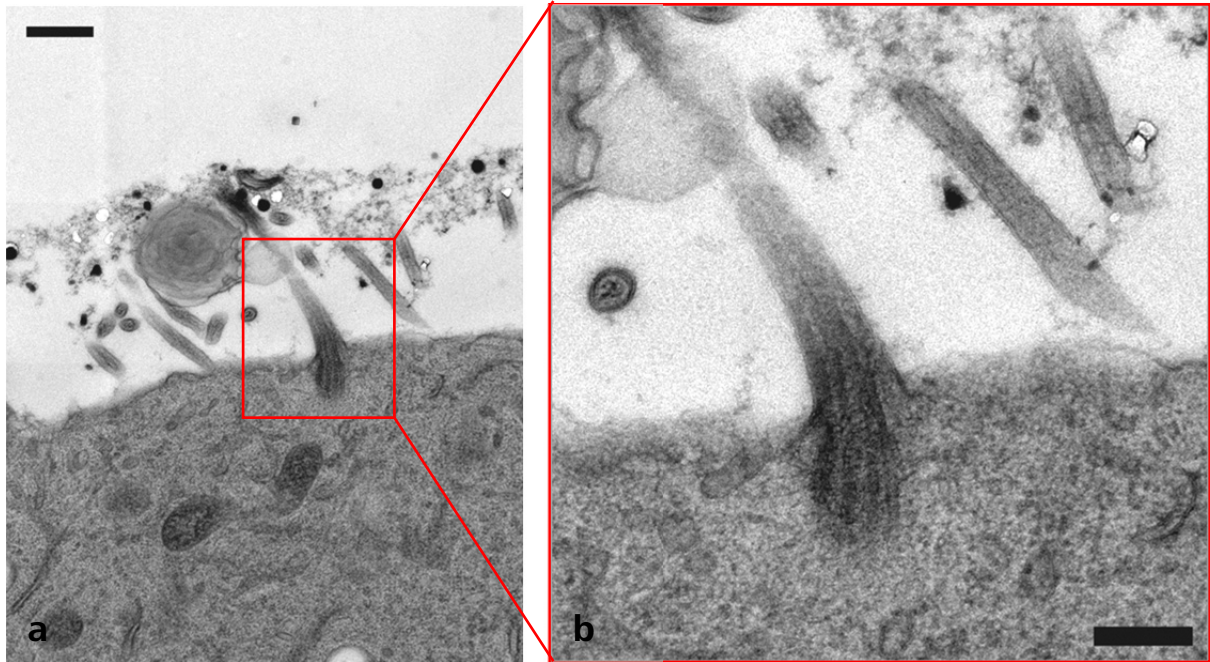


**Abb. 31: 200 nm-Semidünnschnitt der basalen Struktur eines primären Ziliums. a)** 4x4-Montage bei 10.000x-TEM-Vergrößerung (Maßstab 500 nm). **b)** Einzelaufnahme des Ausschnitts der basalen Struktur eines primären Ziliums (Maßstab 250 nm).

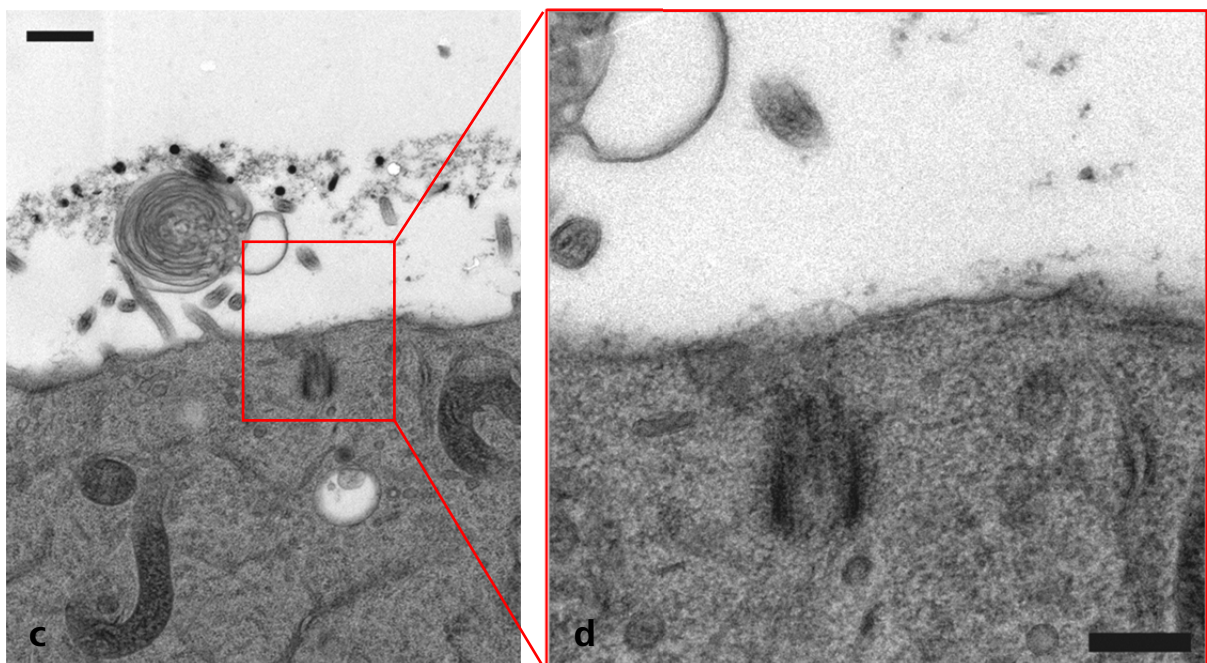


**Abb. 32: 200 nm-Semidünnschnitt der basalen Struktur eines primären Ziliums. a)** 4x4-Montage bei 10.000x-TEM-Vergrößerung (Maßstab 500 nm). **b)** Einzelaufnahme des Ausschnitts der basalen Struktur eines primären Ziliums (Maßstab 250 nm).





**Abb. 33 a – b: 200 nm-Semidünnschnitte in Serie der basalen Struktur eines primären Ziliums. a und c) 4x4-Montagen bei 10.000x-TEM-Vergrößerung (Maßstab 500 nm). b und d) Einzelaufnahmen des Ausschnitts der basalen Struktur eines basalen Ziliums (Maßstab 250 nm).**



**Abb. 33 c – d: 200 nm-Semidünnschnitte in Serie der basalen Struktur eines primären Ziliums. a und c) 4x4-Montagen bei 10.000x-TEM-Vergrößerung (Maßstab 500 nm). b und d) Einzelaufnahmen des Ausschnitts der basalen Struktur eines basalen Ziliums (Maßstab 250 nm).**

In Abb. 31 – 33 a und c ist jeweils eine Übersicht über den Bereich einer Nierenepithel-Zelle gezeigt, in dem ein primäres Zilium im Zytoplasma ‚verankert‘ ist. Diese sog. ‚Ankerstrukturen‘ am primären Zilium (s. I.2.2, I.2.3) sowie intraziliäre Strukturen sind aus diesen TEM-Einzelaufnahmen auch bei hohen Vergrößerungen (Abb. 31 – 33 b und d) durch die ‚dicken‘ 200 nm-Semidünnschnitte schlecht bzw. nicht zu erkennen. Aus diesem Grund wurde an diesen Strukturen TEM-Tomographien durchgeführt, um mehr räumliche Informationen rund um die Basalstruktur des primären Ziliums zu erhalten.

### **3.3 3D-Rekonstruktionen von hochdruckgefrorenen, gefriersubstituierten Nierenepithelzellen**

Von den drei gezeigten repräsentativen Basalstrukturen von primären Zilien von Nierenepithelzellen (Abb. 31 – 33) wurden TEM-tomographische Aufnahmen gemacht und diese Kippserien mittels IMOD rekonstruiert. Diese errechneten 3D-Rekonstruktionen wurden anschließend mittels AMIRA® segmentiert, visualisiert und 3D-Modelle davon erstellt (s. III.3.3).

Die Abb. 34 zeigt die mittels IMOD erstellte 3D-Rekonstruktion der in Abb. 31 dargestellten Basalstruktur eines primären Ziliums. Die gesamte 3D-Rekonstruktion ist auf der Begleit-CD als Filmdatei dargestellt (s. VI.3 Begleit-CD → Movie zu Abb. 34). In der großen Aufnahme, welche die xy-Ansicht der 3D-Rekonstruktion darstellt, sieht man einen Längsschnitt durch den basalen Teil des primären Ziliums, welches in diesem Ausschnitt leicht aus der Zytoplasmamembran herausragt. Die dunklen länglichen Strukturen im Zytoplasma stellen Teile des Mikrotubuli-Axonems des Basalkörperchens dar (s. I.2.2). Die rechts und unterhalb der großen Aufnahme gezeigten Ausschnitte zeigen sowohl die yz-Ansicht (rechts) als auch die xz-Ansicht (Mitte der Abb. 34) dieses Schnittes des fertigen 3D-Tomogramms, anhand deren u. a. auch die Qualität der Rekonstruktion kontrolliert werden kann. Im Zytoplasma sind mehrere vesikuläre Strukturen zu erkennen und im Gegensatz zu der TEM-Aufnahme des kompletten Semidünnschnitts (Abb. 31) ist in dieser Darstellung einer einzelnen Ebene der Rekonstruktion ebenfalls eine vesikuläre Struktur im Inneren des primären Ziliums auszumachen. Die unten abgebildeten Aufnahmen zeigen Serien sowohl der Übersicht des primären Ziliums als auch der vesikulären Struktur bei höherer Vergrößerung, bei welcher (s. untere Abbildungen 34) eine Doppelmembran eindeutig zu erkennen ist, welche die Gestalt eines Vesikels beweist. Diese Aufnahmen haben jeweils einen Abstand von 7 nm zueinander; d. h. der gesamte Abstand von der ersten bis zur letzten gezeigten Aufnahme ist 28 nm. In allen Aufnahmen ist die vesikuläre Struktur samt ihrer umgebenden Doppelmembran zu erkennen. Sowohl das Vorhandensein einer Doppelmembran als auch die Größe von ~30 nm lassen auf ein intraziliäres Vesikel schließen.



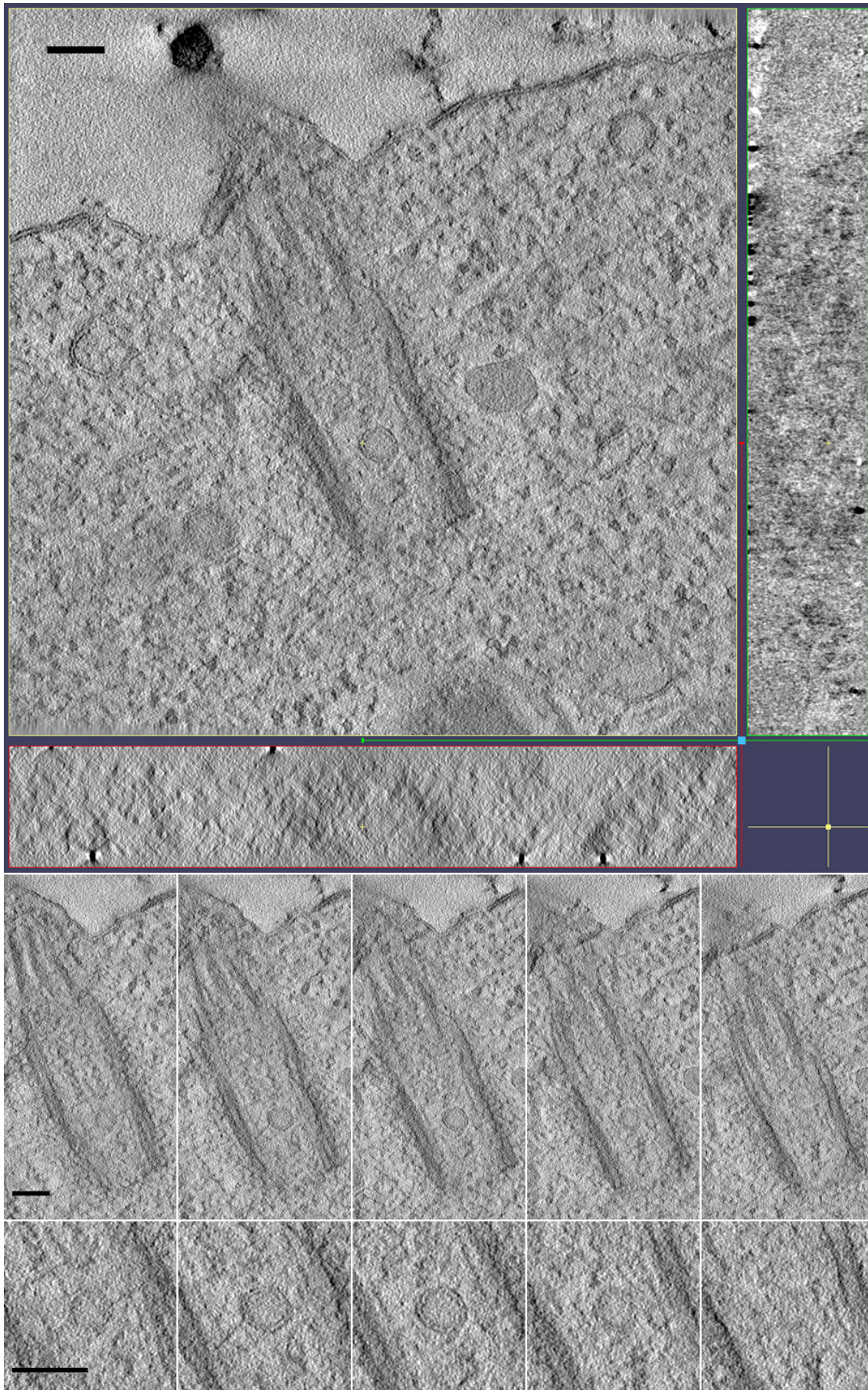


Abb. 34: 3D-Tomogramm von der in Abb. 31 gezeigten Basalstruktur eines primären Ziliums.



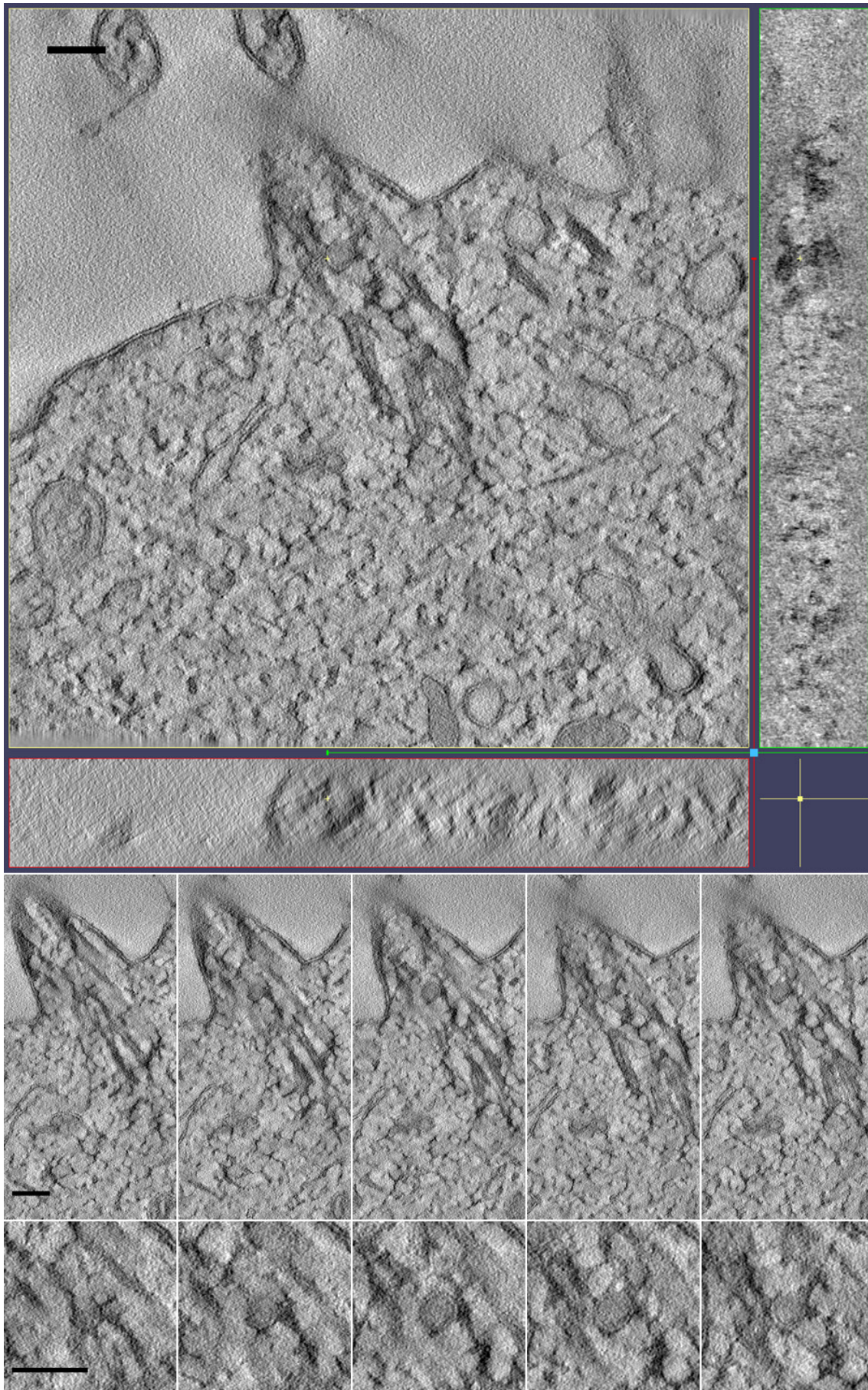


Abb. 35: 3D-Tomogramm von der in Abb. 32 gezeigten Basalstruktur eines primären Ziliums.



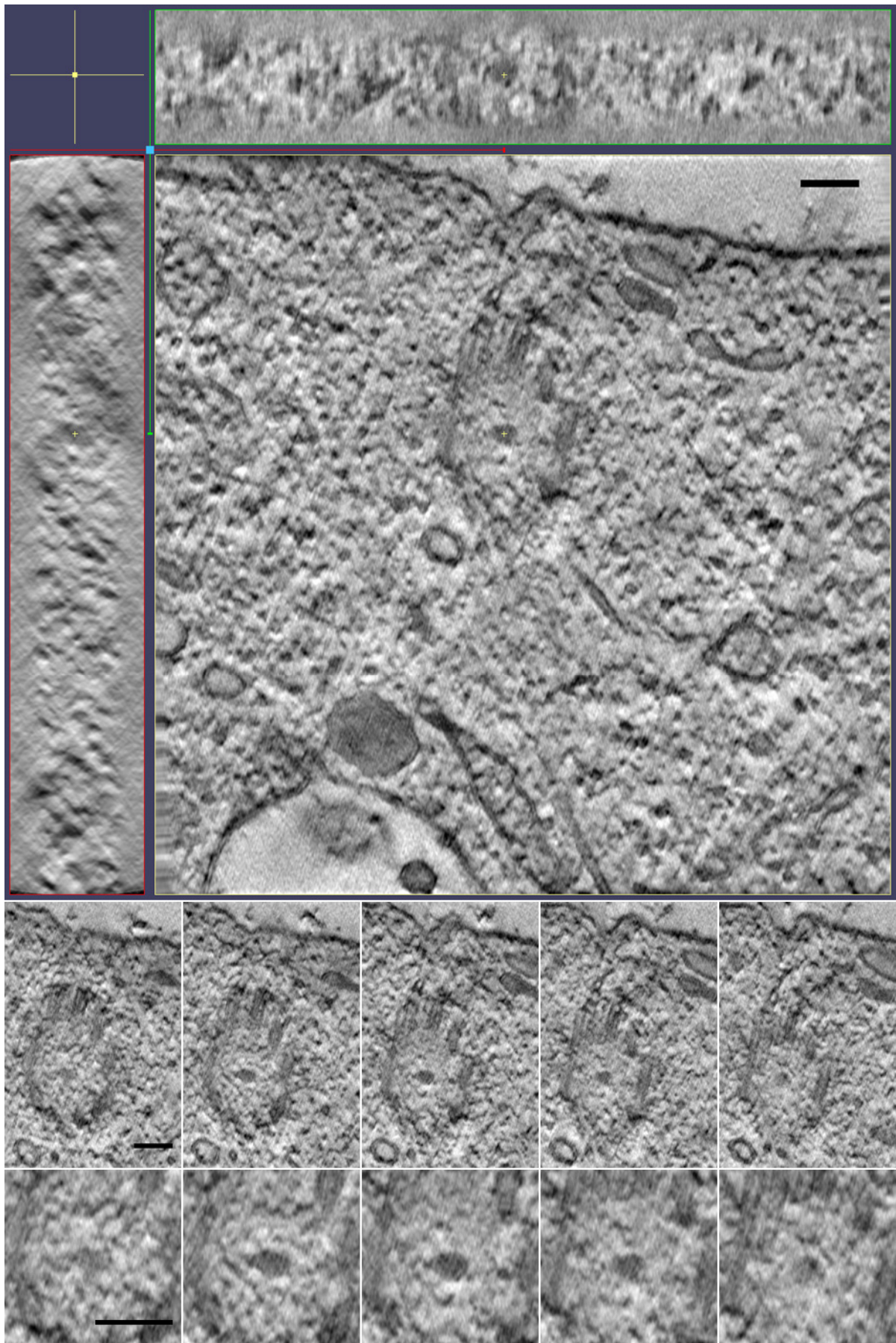


Abb. 36: 3D-Tomogramm von der in Abb. 33 gezeigten Basalstruktur eines primären Ziliums.



In Abb. 35 ist die 3D-Rekonstruktion der in Abb. 32 gezeigten ‚Übergangszone‘ des primären Ziliums dargestellt. Auch hierzu ist eine Filmdatei der gesamten 3D-Rekonstruktion auf der Begleit-CD zu dieser Arbeit (s. VI.3 Begleit-CD → Movie zu Abb. 35) zu finden. Die große Aufnahme in Abb. 35 zeigt wiederum die xy-Ansicht eines Längsschnitts durch den basalen Teil bzw. der ‚Übergangszone‘ eines primären Ziliums. Die Doppelmembranen sowohl bei der Zytoplasmamembran als auch bei den intra- und extrazellulären Vesikeln sprechen für eine gute Erhaltung der Zelle während der Kryo-Präparation. Obwohl auf den ersten Blick bei der großen Aufnahme kein eindeutiges intraziliäres Vesikel zu erkennen ist, zeigen die unteren Serien-Aufnahmen, welche jeweils einen Abstand von 6 nm zueinander haben, im Inneren des Basalkörperchens eine vesikuläre Struktur umgeben von einer Doppelmembran. Da diese runde Struktur v. a. bei höherer Vergrößerung in allen Serien-Aufnahmen mit einem Gesamtabstand von 24 nm zu sehen ist, weist dies auf eine Größe von mindestens 25-30 nm hin, was ebenfalls für ein intraziliäres Vesikel spricht.

Im Gegensatz zu den vorherigen beiden Abbildungen ist in Abb. 36 kein Längsschnitt, sondern ein Quer- bzw. Tangentialschnitt durch das Basalkörperchen eines primären Ziliums gezeigt. Die komplette Rekonstruktion befindet sich in Form einer Filmdatei auf der zu dieser Arbeit beigefügten Begleit-CD (s. VI.3 Begleit-CD → Movie zu Abb. 36). Die große Aufnahme zeigt wiederum die xy-Ansicht des 3D-Tomogramms und die beiden Ausschnitte oberhalb und links von der Aufnahme die xz- und yz-Ansicht, anhand deren u. a. die Qualität der Rekonstruktion kontrolliert werden kann. Für eine gute Zellerhaltung sprechen auch bei diesem Präparat die bei den intrazellulären vesikulären Strukturen zu erkennenden Doppelmembranen. Die kreisförmig angeordneten länglichen Strukturen, die aus der Ebene zu ragen scheinen, stellen das Mikrotubuli-Achsen skelett des Basalkörperchens (s. I.2.2) dar. Im Inneren des Axonems ist eine kleine ‚punktförmige‘ dunkle Struktur zu erkennen. Bei höherer Vergrößerung (s. untere Serien-Abbildungen) ist auch hier eine Doppelmembran sichtbar (v. a. mittlere kleine Aufnahme bei höherer Vergrößerung). Diese Serien-Aufnahmen haben jeweils einen Abstand von 7 nm zueinander und somit einen Gesamtabstand von 28 nm. Da diese vesikuläre Struktur auch hier in allen der gezeigten Serien-Aufnahmen zu sehen ist, spricht dies für eine Größe von ~30 nm, was wiederum auf ein intraziliäres Vesikel hindeutet.

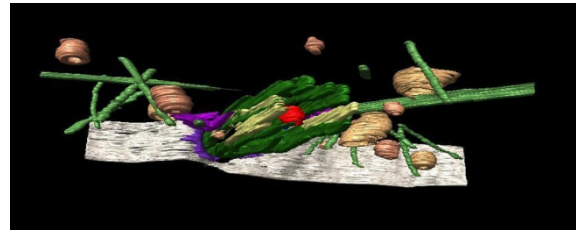
### 3.4 3D-Visualisierungen anhand TEM-tomographischer Aufnahmen

Die in III.3.3 vorgestellten Ergebnisse der 3D-Rekonstruktionen von TEM-tomographischen Aufnahmen von repräsentativen primären Zilien wurden mittels AMIRA®, einem wissenschaftlichen 3D-Visualisierungs- und Grafikverarbeitungsprogramm, segmentiert und visualisiert (angefertigt von studentischen Hilfskräften: Carolin Seebauer, Sebastian Koschade und Niklas Verloh).

Die unterschiedlichen Zellkompartimente bzw. –bestandteile wurden in allen 3D-Modellen in den Abb. 37 – 39 in identischen Farben dargestellt:

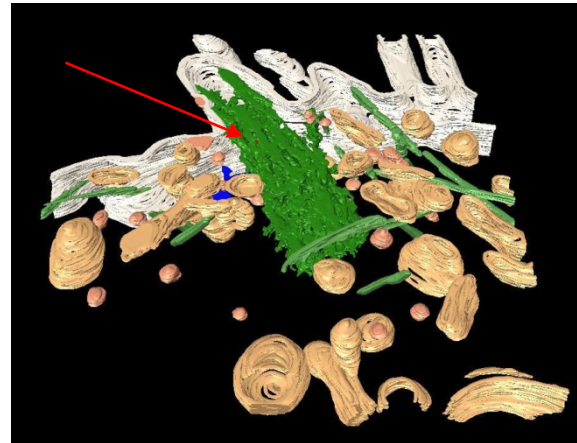
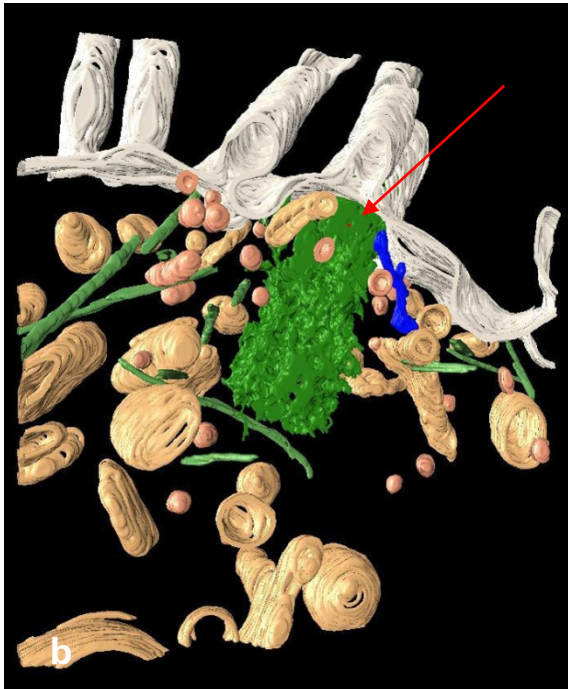
weiß	= Zytoplasmamembran
grün	= Mikrotubuli des primären Ziliums bzw. dessen Basalkörperchen
hellgrün	= intrazelluläre Mikrotubuli
beige-Töne	= intrazelluläre Vesikel & Kompartimente
lila	= eventuelle IFT Transport Proteine (Pazour et al., 2004)
pink	= ‚basale Füßchen- und Kappenstrukturen‘
blau	= ‚Übergangsfasern‘
rot	= intraziliäre Vesikel
gelb	= eventuelle Verbindungsstruktur zwischen intraziliärem Vesikel und Mikrotubuli

Die dazugehörigen Filmdateien der 3D-Visualisierungen sind auf der zu dieser Arbeit beigelegten Begleit-CD zu finden (s. VI.3 Begleit-CD → Movies zu Abb. 37 - 39).



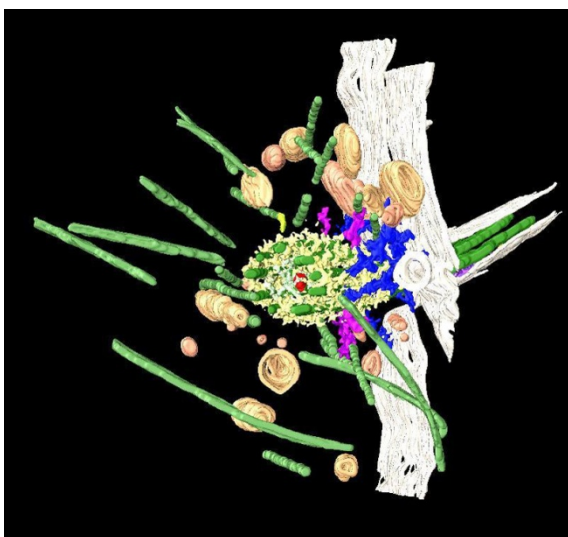
**Abb. 37: 3D-Modell der 3D-rekonstruierten Basalstruktur eines primären Ziliums (vgl. Abb. 31 & 34)**

a) vertikale Ansicht  
b) horizontale Ansicht



**Abb. 38: 3D-Modell der 3D-rekonstruierten Basalstruktur eines primären Ziliums (vgl. Abb. 32 & 35)**

a & b) unterschiedliche Blickwinkel: rote Pfeile deuten auf vesikuläre Struktur im Inneren des Mikrotubuli-Achsenskeletts hin



**Abb. 39: 3D-Modell der 3D-rekonstruierten Basalstruktur eines primären Ziliums (vgl. Abb. 33 & 36)**

In allen drei 3D-Visualisierungen sind unterhalb der Zytoplasmamembran (weiß) im Zytoplasma verlaufende Mikrotubuli (hellgrün) und vesikuläre Strukturen und sonstige Zellkompartimente bzw. –organelle (beige-Töne) zu sehen. An den Mikrotubuli des Basalkörperchens (grün) sind weitere Strukturen zu erkennen: die zu der Zytoplasmamembran ziehenden ‚Übergangsfasern‘ (blau; s. I.2.2) und die ins Zytoplasma reichenden ‚basalen Füßchen und –kappen-Strukturen‘ (pink; s. I.2.2). Alle drei 3D-Modelle zeigen anschaulich, dass sich die roten vesikulären Strukturen im Inneren der Mikrotubuli-Achsen skelette der Basalkörperchen bzw. der ‚Übergangszone‘ zum Axonem des Schaftes der primären Zilien befinden.

In Abb. 37 und den dazugehörigen Filmdateien (s. VI.3 Begleit-CD → Movies zu Abb. 34 & 37) ist das 3D-Modell der in Abb. 31 und 34 gezeigten Basalkörperchen eines primären Ziliums dargestellt. Bei diesem Modell sind weitere Strukturen (lila) zu sehen, welche zwischen der ziliären Plasmamembran und dem Mikrotubuli-Axonem des Ziliumschaftes verlaufen. Diese werden u. a. als Begleitproteine und/oder ‚Flöße‘ zum Transport von IFT-Proteinen beschrieben (Pazour, 2004). In diesem Modell sind zwei dreieckig geformte Strukturen (pink) zu erkennen, welche die ‚basalen Füßchen- und Kappen-Strukturen‘ darstellen. Ein drittes Dreieck ist in Abb. 37a (pink; rechts unten) angedeutet. In Abb. 37a ist auch ein Strang der ‚Übergangsfasern‘ (blau), welche sich sektglasförmig von dem Basalkörperchen (grün) zur Zytoplasmamembran erstrecken, gekennzeichnet. Im Inneren des Basalkörperchens (grün), was v. a. in Abb. 37b sehr anschaulich dargestellt ist, befindet sich ein Vesikel (rot). In diesem Fall war bei der Segmentierung und Visualisierung eine Struktur abgehend von dem Vesikel zu einem der Mikrotubuli-Triplets zu erkennen (hier: gelb dargestellt).

Die Abb. 38 und die entsprechenden Filmdateien (s. VI.3 Begleit-CD → Movies zu Abb. 35 & 38) zeigen das 3D-Modell des in Abb. 32 und 35 beschriebenen Basalkörperchens und der ‚Übergangszone‘ eines primären Ziliums. Bei dieser 3D-Visualisierung sind mehrere intrazelluläre Strukturen und Kompartimente (beige-Töne) in unterschiedlichen Größen dargestellt. Das Mikrotubuli-Achsen skelett (grün) ist in diesem Beispiel sehr kompakt und erlaubt leider nur minimale Einblicke in sein Inneres. Die roten Pfeile jedoch deuten auf das Vesikel hin, welches sich im Inneren des Basalkörperchens bzw. an der ‚Übergangszone‘ in den Schaft des primären Ziliums befindet.

Ein weiteres 3D-Modell des in Abb. 33 und 36 gezeigten Quer- bzw. Transversalschnitts eines Basalkörperchens wird in Abb. 39 und in den dazugehörigen Filmdateien (s. VI.3 Begleit-CD → Movies zu Abb. 36 & 39) veranschaulicht. Hier sind erneut zahlreiche zytoplasmatische Mikrotubuli (hellgrün) und intrazelluläre Vesikel & Kompartimente (beige-Töne) zu sehen. Dieses Beispiel zeigt deutlich die ‚Übergangsfasern‘ (blau), die das Basalkörperchen mit der Zytoplasmamembran verbinden. Auch die ‚basalen Füßchen- und Kappenstrukturen‘ (pink), welche vom Basalkörperchen aus ins Zytoplasma reichen, sind rings um das Mikrotubuli-Achsen skelett angeordnet. Beim Seg-

---

mentieren und Visualisieren dieses Modells wurden weitere feine Strukturen am Basalkörperchen deutlich (hier: hellgelb dargestellt). Diese das Basalkörperchen einhüllende Struktur wurde bereits als perizentrioläres Material (PCM; Moser et al., 2010) beschrieben. Beim Blick in das Innere des Basalkörperchens sieht man das zentral lokalisierte Vesikel (rot).

## IV Diskussion

Thematischer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) (s. I.1.1). Die Erbkrankheit wird unter anderem durch einen Defekt im *PKD2*-Gen verursacht, welches für das integrale Membranprotein Polycystin-2 (s. I.1.2) kodiert. Dieses ist intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum, in Bereichen des Golgi-Apparates, in der Zytoplasmamembran und auch im primären Zilium lokalisiert. Ziel dieser Arbeit war es, mehr über den Transport von Polycystin-2 zum und im primären Zilium zu erfahren.

Primäre Zilien werden schon seit Ende des 19./Anfang des 20. Jahrhunderts erforscht (Sorokin, 1968; Sorokin, 1962; Gibbons and Grimstone, 1960). In der Niere wurden sie erstmals im Jahr 1898 beschrieben (Zimmermann, 1898). Sie galten lange als ein funktionsloses evolutionäres Überbleibsel (Webber and Lee, 1975). Eine Reihe von Studien warfen jedoch eine ziliäre Hypothese auf, welche besagt, dass das Zilium im Zentrum der Pathogenese bei der polyzystischen Nierenerkrankung steht; sie wurde dadurch untermauert, dass in Knockout-Mäusen der Verlust von Genen, die essentiell für die Ziliogenese sind, zu zystischen Nierenerkrankungen führt (Davenport et al., 2007; Lin et al., 2003).

Primäre Zilien werden mittlerweile als sog. sensorische Antennen bei Zellen beschrieben (Singla and Reiter, 2006; Pazour et al., 2003). Sie kommen als ein eigenständiges und jeweils einzeln auftretendes Zellorganell bei nahezu allen (menschlichen) Zelltypen vor (Wheatley, 1982; <http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist.html>). Dabei werden ihre Funktionen bei der Signalübertragung vielseitig diskutiert: als ein von der apikalen Zelloberfläche in den Extrazellulärraum ragendes Zellkompartiment können sie dort mechano-, chemo- und photosensorische Funktionen übernehmen (Davenport and Yoder, 2005). Die aus ihrer Umgebung erhaltenen Signale leiten die primären Zilien in das Innere der Zellen weiter (Singla and Reiter, 2006), wobei sie zahlreiche Signalübertragungswege modulieren und Prozesse wie Mitose, Zellproliferation und/oder die Bestimmung der Zellpolarität beeinflussen bzw. regulieren. Aufgrund der Befunde, dass ein Fehlverhalten bzw. eine Fehlbildung der primären Zilien zu einer Vielzahl von Entwicklungsdefekten bei den Organen und somit zu den unterschiedlichsten Erkrankungen, den sog. Ziliopathien, führen kann (Hildebrandt et al., 2011; Pazour et al., 2004), wird ihnen eine Schlüsselrolle sowohl bei intra- als auch interzellulären Signalübertragungswegen zugeschrieben. Eine sog. ziliäre Dysfunktion stellt daher eine zellbiologische Ursache für die Entwicklung einer polyzystischen Nierenerkrankung dar (Pazour et al., 2000) (s. I.1.1). Inzwischen wurden eine Vielzahl von Proteinen, darunter das für diese Arbeit relevante integrale Membranprotein Polycystin-2, bei denen Mutationen als ursächlich für polyzystische Nierenerkrankungen des Menschen oder für zystische Nieren bei verschiedenen Mausmodellen identifiziert wurden, in primären Zilien gefunden (Hildebrandt et al., 2011; Pazour et al., 2000).

In der Literatur werden mögliche Transportwege und –mechanismen von integralen Membranproteinen kontrovers diskutiert (Nachury et al., 2010).

## **1 Diskussion der angewandten transmissionselektronenmikroskopischen Methoden**

Ziel dieser Arbeit war es, den Transportweg des integralen Membranproteins Polycystin-2 zum und im primären Zilium mittels elektronenmikroskopischer Verfahren aufzudecken. Zum einen wurde eine Methode zur korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie an den angewandten Zellsystemen etabliert, um den Verlauf des Proteins verfolgen zu können. Weiterhin wurden transmissionselektronenmikroskopische Tomographien zur 3D-Rekonstruktion und –Visualisierung von den gewünschten Strukturen erstellt, um dahingehend dreidimensionale Einblicke zu erlangen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beide angewandten transmissionselektronenmikroskopischen Methoden zur Analyse von Zelllinien, die mit Varianten des Zielproteins verändert werden, geeignet sind; sie tragen dazu bei zu verstehen, wie das Protein Polycystin-2 in das primäre Zilium transportiert wird und wie das Basalkörperchen bzw. das primäre Zilium dieser Zellen im Detail aufgebaut ist. Dabei stellte sich die Etablierung und Optimierung beider Methoden als schwieriger und zeitaufwendiger heraus, als anfänglich vermutet.

### **1.1 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie**

Für die Versuche zur Visualisierung des integralen Membranproteins Polycystin-2 mittels korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie wurde im Zuge dieser Arbeit eine Tetracystein-basierte Detektionsmethode mittels ReAsH-EDT<sub>2</sub> etabliert (s. II.9). ReAsH-EDT<sub>2</sub> und auch FIAsh-EDT<sub>2</sub>, welches aber aufgrund einer nicht ausreichenden oxidierenden Eigenschaft nicht zur korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie geeignet ist (s. I.4.1) sind lipophile Zellmembran-permeable biarsenische Reagenzien (Adams and Tsien, 2008; Machleidt et al., 2007) zur Fluoreszenz-Markierung von Tetracystein-markierten Proteinen. Sie sind selber nicht fluoreszierend, aber bilden nach spezifischer Bindung an ein Tetracystein-Motiv (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys; s. I.4.2) einen fluoreszierenden Komplex (Griffin et al., 1998). Dieses sechs Aminosäuren lange Motiv wird in eine Zielsequenz eines rekombinanten Proteins kloniert und anschließend eine stabile und/oder transiente Zelllinie (hier: LtTA-2,22-Zellen) generiert (s. II.2.6.2; s. III.1.1). Die Abbildungen 11 a – d zeigen mehrere Beispiele von stabil generierten LtTA-2,22-Zellen im induzierten (-Dox) und nicht-induzierten (+Dox) Zustand, welche unterschiedliche Varianten des Polycystin-2-Proteins inklusive des Tetracystein-Motivs exprimieren. Dabei ist auch an den Bandenstärken zu erkennen, dass die jeweiligen Proteine in unterschiedlichen Mengen in den Zellen exprimiert werden. Zudem ist in Abb. 11 auch nur der Teil der durchgeführten Experimente dokumentiert, der für weiterführende Experimente

ein Erfolg versprechendes Ergebnis zeigte. Die Expressionsraten nach stabiler Transfektion der LtTA-2,22-Zellen mit den zuvor klonierten Polycystin-2-Mutanten inklusive des Tetracystein-Motivs waren sehr gering. Da die Expressionsrate in rekombinanten Zelllinien gewöhnlich 40 bis 400fach höher als in nativen Zellen ist, wurde daher die transiente Transfektion herangezogen, um die Expressionsraten der gewünschten Polycystin-2-Mutanten zu erhöhen. Bei der transienten Transfektion wird allerdings, im Gegensatz zum dauerhaften Einbau des Plasmids in das Genom der Wirtszelle, das Plasmid nur vorübergehend in die Wirtszellen eingebracht. Folglich wurden bei diesen Versuchen keine stabilen LtTA-2,22-Zelllinien mit den jeweiligen Polycystin-2-Varianten generiert.

Die für die Durchführung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie notwendige ReAsH-Fluoreszenz war in den die Polycystin-2-Mutanten exprimierenden Zellen sehr schwach, was dann auch die notwendige Photooxidations-Reaktion mitunter zu schwach ausfallen ließ. Beim Arbeiten mit Fluoreszenz-Farbstoffen in der Lebend-Zell-Mikroskopie muss man beachten, dass das Leuchten der Fluorophore, welche dabei große Mengen an reaktiven Sauerstoff-Spezies freisetzen, phototoxisch auf die Zellen wirken kann. Diese Fluorophore allerdings sind wiederum gut geeignet für die Photooxidation und Ausfällung des Diaminobenzidins (DAB) (Meisslitzer-Ruppitsch et al., 2010), da für diese Photooxidations-Reaktion der durch die Fluoreszenz freigesetzte radikale Sauerstoff benötigt wird. Die freigesetzten Sauerstoff-Derivate reagieren mit den durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von ~585 nm angeregten DAB-Moleküle (vgl. I.4.2 Abb. 10), welche dadurch oxidiert werden. Diaminobenzidin wird somit als Polymer ausgefällt, welches wiederum als osmiophile Substanz für die anschließende Elektronenmikroskopie genutzt wird. Ist also von Beginn des Versuchs an die ReAsH-Fluoreszenz zu schwach, kann die Photooxidations-Reaktion nicht (vollständig) ablaufen und nicht genügend DAB-Präzipitat entstehen, an welches das kontrastierende Osmiumtetroxid binden kann, um die zu untersuchenden Strukturen im Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbar zu machen. Die Abb. 10 (s. I.4.2) veranschaulicht das Prinzip der zur korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie angewandten Methode der Tetracystein-basierten Proteindetektion mittels ReAsH-EDT<sub>2</sub>.

Die ReAsH-Fluoreszenz stellte auch ein Problem bei der Dokumentation dar. Durch das Belichten bei der Probensuche und einer anschließenden Bildaufnahme wurde die generell schon schwache Fluoreszenz durch Ausbleichen weiter reduziert/minimiert, so dass z. T. keine Photooxidation mehr ablaufen konnte. Daher wurde zur Hilfestellung für die ReAsH-Etablierungsversuche zusätzlich zum Tetracystein-Motiv eine GFP-Sequenz in die jeweiligen Polycystin-2-Konstrukte eingebaut. Die Verwendung von GFP sollte anfangs allerdings vermieden werden, da bereits bekannt war, dass das Volllängen-Polycystin-2-Protein mit einer einklonierten GFP-Sequenz nicht in das primäre Zilium transportiert wird. Zur Durchführung dieser Etablierungsversuche jedoch wurden mehrere Sequenz-Abschnitte im Volllängen-Polycystin-2 zum Einbau der GFP-Sequenz getestet. Dabei stellte sich heraus, dass das Volllängen-Polycystin-2 inklusive eines Tetracystein-Motivs und einer GFP-



Sequenz, welches am N-Terminus des Proteins einkloniert wurde, in das primäre Zilium wandert (s. VI.1 Abb. 41a [weiße Pfeile], bis dato noch keine TEM-Daten vorhanden). Die zusätzliche GFP-Fluoreszenz war bei der Suche und Dokumentation von interessanten Probenstellen behilflich, so dass dabei die für die Photooxidation notwendige ReAsH-Fluoreszenz nicht frühzeitig ausbleichen konnte. Wie aus der Literatur bekannt, kann auch die GFP-Fluoreszenz zur Photooxidations-Reaktion genutzt werden. Allerdings sind nur wenige erfolgreiche Beispiele hierfür bekannt (Grabnbauer et al., 2005; Jakobs et al., 2003; Monosov et al., 1996) und der Einsatz von GFP zur Photokonversion wird kontrovers diskutiert (effective: Raifur et al., 2002; poor efficiency: Surrey et al., 1998; ineffective: Tour et al., 2003; conclusion: Meisslitzer-Ruppitsch et al., 2010). Daher wurde sie im Zuge dieser Arbeit lediglich als Hilfs-Fluoreszenz eingesetzt und die Tetracystein-basierte Protein-detektion mittels ReAsH zur Methode der Wahl für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie etabliert.

Zur Durchführung, Etablierung und Optimierung der Methode der Tetracystein-basierten Protein-detektion mittels ReAsH wurde bei einem 14-tägigen Exkurs die Durchführung des Verfahrens am National Center for Microscopy and Imaging Research (NCMIR) an der University of California in San Diego (CA, USA) am institutseigenen Zellsystem erlernt. Es sind mehrere Reagenzien zur Durchführung der Methode notwendig, deren optimale Konzentrationen erst getestet werden mussten (s. II.9.3). Bei einem optimalen Versuchsverlauf vergingen von Beginn mit der transienten Transfektion der LtTA-2,22-Zellen mit dem jeweiligen Polycystin-2-Plasmid inklusive Tetracystein-Motiv bis hin zur transmissionselektronenmikroskopischen Analyse in etwa 2 Wochen. Dies soll verdeutlichen, dass es sich bei elektronenmikroskopischen Präparationen meist um zeitaufwendige Verfahren handelt und das Ändern von eingesetzten Parametern, Konzentrationen der Lösungen und/oder Lage der Schnittebene nicht immer zeitnah erfolgen kann.

Die korrelative Mikroskopie bezeichnet die Verknüpfung von unterschiedlichen Mikroskopietechniken, bei der Probenpräparation, bei der Aufzeichnung der Bilddaten, und bei ihrer Auswertung und Interpretation. Die Kombination verschiedener Darstellungsverfahren an ein und derselben Probenstelle erlaubt einen zusätzlichen Informationsgewinn, da verschiedene sich ergänzende Informationen zugeordnet und unterschiedliche Größenordnungen bezogen auf Auflösung und Bildfeld erfasst werden können. Weitgehend automatisierte Systeme können bei der Untersuchung einen entscheidenden Zeitvorteil gewähren. Ein wesentlicher Aspekt der korrelativen Mikroskopie ist das Wiederfinden ein- und derselben Probenstelle im Licht- und anschließend im Transmissions-Elektronenmikroskop. Im Bereich der korrelativen Licht- und Rasterelektronen-Mikroskopie kann dies bereits automatisiert in einem einzigen Gerät stattfinden (z. B. Hybrid SEM / Clairscope™, JASM-6200; JEOL (Germany) GmbH, Eching b. München). Ein Kombinations-Mikroskop, das sowohl Fluoreszenz-Lichtmikroskopie (allerdings bis dato nur mit einer Fluoreszenz-Wellenlänge für GFP) als auch TEM an einem Gerät (Tecnai™ with iCorr™; FEI Co., Eindhoven, NL) inte-

griert und daher Untersuchungen mit beiden Techniken am identischen Präparat ermöglicht, wurde erstmals und bis heute einmalig an der Universität Utrecht realisiert (Agronskaia et al., 2008). Solche integrierten Mikroskopie-Systeme standen bei der Durchführung am Institut allerdings nicht zur Verfügung. Um daher funktionelle Informationen aus der Fluoreszenz- und/oder Lichtmikroskopie mit (ultra)strukturellen Informationen aus der Elektronenmikroskopie zusammen darzustellen, wurden hierzu alle notwendigen Schritte händisch durchgeführt. Um die Problematik dabei zu verdeutlichen, wird hier das Beispiel des Wiederfindens ein- und derselben Probenstelle erläutert. Nachdem das GFP-Signal der zu untersuchenden Probenstelle dokumentiert (s. VI.1 Abb. 41a [weiße Pfeile]) worden war, wurde die Photokonversions-Reaktion mittels der ebenfalls vorhandenen ReAsH-Fluoreszenz, Diaminobenzidin (DAB), Sauerstoffzufuhr und durch Anregung mit einer Wellenlänge von  $\sim 585$  nm durchgeführt (s. II.9.4). Die zu untersuchenden Zellen wurden dafür in geeigneten Kulturschalen (s. VI.1 Abb. 40) gezüchtet und jeweils mit dem entsprechenden PKD2-Plasmidkonstrukt inklusive Tetracystein-Motiv und GFP-Sequenz transient transfiziert. Diese  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> mit Grid-500 besitzen einen dünnen Boden für hochauflösende Lichtmikroskopie (ibidi GmbH, München). Die Verwendung von hochqualitativen Deckgläsern mit einer selektierten Dicke von  $170\text{ }\mu\text{m}$  ( $\pm 10\text{ }\mu\text{m}$ ) ermöglicht alle Arten von Lichtmikroskopie mit bis zu 100x Objektiven. In das Mikroskop-Deckglas am Schalenboden ist ein Gitter eingepreßt, welches im Mikroskop deutlich sichtbar ist. Es besteht aus 400 Quadraten mit  $500\text{ }\mu\text{m}$  Kantenlänge. Dieses Gitter befindet sich im Mikroskop in derselben fokalen Beobachtungsebene wie die darin kultivierten Zellen. Dadurch wird das Suchen und Wiederfinden von Probenstellen erleichtert (s. VI.1 Abb. 40). Für die korrelative Mikroskopie bedeutet das, dass die jeweilige Position anhand der Gitter-Koordinaten notiert werden, und diese zu einem späteren Zeitpunkt nach der Photokonversion, Fixierung der Zellen und der weiteren elektronenmikroskopischen Präparation wiedergefunden werden kann (s. VI.1 Abb. 41). Anhand der Gitter-Koordinaten konnte die gewünschte Stelle in der eingebetteten Probe ausgesägt und grob zugetrimmt werden. Eine leichte Veränderung der Zellformen und -anordnungen kann z. B. bei der Fixierung der Zellen und/oder beim Einbetten in das Kunstharz erfolgt sein. Zusätzlich darf nicht vergessen werden, dass man im Lichtmikroskop den Umriss einer ganzen Zelle in Projektion vor sich hat, dagegen im TEM immer nur ein (Ultra)-Dünnschnitt ( $50 - 200\text{ nm}$ ) einer Zelle (ca.  $1 - 2\%$  einer Zelle) betrachtet wird, was mitunter einen deutlich anderen Umriß der Zelle zur Folge hat. Für die folgende Herstellung von Ultradünnschnitten (in Serie) muss der noch vorhandene Boden der Kulturschale von dem Kunstharz und den eingebetteten Zellen entfernt werden. Dies wiederum ist ein heikler Schritt, da dabei die Gefahr besteht, die am Boden aufgewachsenen und fixierten Zellen mitabzulösen (s. VI.1). Im vorliegenden Fall wurden die Ultra- und/oder Semidünnschnitte nach feinerem Zutrimmen auf die Probenstelle in horizontaler Schnittebene durchgeführt. War die Fragestellung allerdings auf das primäre Zilium ausgerichtet, musste das jeweilige Probenblockchen erneut eingebettet werden,

sodass die Schnitttrichtung für die Ultramikrotomie in vertikaler Ebene relativ zu den Zellen erfolgen konnte.

Ein weiterer limitierender Faktor zum beschriebenen hohen Zeitaufwand war die eigentliche Analyse am Transmissionselektronen-Mikroskop (CM 12; 120 kV; FEI Co., Eindhoven, NL und EM 902; 80 kV; Zeiss, Oberkochen) selbst. Diese beiden Mikroskope, insbesondere die verfügbaren Probenhalter und die nicht automatisierte Verschiebung der Probe (Navigation), sind nur bedingt geeignet für Arbeiten mit hohem Probendurchsatz.

## 1.2 Tomographie

Auch für die elektronentomographischen Anwendungen waren die beiden am Institut verfügbaren Transmissions-Elektronenmikroskope nicht geeignet. Am EM902 (80 kV; Zeiss, Oberkochen) können die Proben prinzipiell nicht euzentrisch gekippt werden, was die Durchführung einer Tomographie durch Probenkipfung von vorneherein ausschließt; dagegen können am CM 12 (120 kV; FEI Co., Eindhoven, NL) zumindest mit einem Tomographie-Probenhalter manuelle Tomographien erstellt werden. Allerdings war es an diesem Gerät nicht möglich, Elektronen-Tomographie-Serien mit automatischer Probenkipfung durchzuführen, da das Goniometer nicht ansteuerbar ist. Limitierend war zusätzlich die anwendbare Hochspannung von ‚nur‘ 120 kV am CM 12. Für die bei dieser Arbeit relevante Fragestellung, der Untersuchung der Ultrastruktur von primären Zilien bzw. deren Basalkörperchen, wurden 200 nm Semi-Dünnschnitte angefertigt, um die Chance zu erhöhen, ein primäres Zilium mit einem Durchmesser von ~200 nm im Ganzen auf einem Dünnschnitt zu erhalten. Für eine einzelne transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle eines im TEM ungekippten 200 nm-Semi-Dünnschnittes sind 120 kV durchaus ausreichend; wird die Probe allerdings für tomographische Aufnahmen im TEM gekippt, erhöht sich die Probendicke (Faktor 3 bei 70° Kippung) und die Hochspannung von 120 kV ist nicht mehr ausreichend, um von der zu durchstrahlenden, gekippten Probe aussagekräftige Bilder mit gutem Kontrast zu erstellen (Leis et al., 2009; Grimm et al., 1998). Die in dieser Arbeit gezeigten tomographischen Aufnahmen und Ergebnisse im Hinblick auf den Transport des integralen Membranproteins Polycystin-2 ins primäre Zilium und dessen ultrastrukturelle Analyse wurden an einem 200 kV-Transmissions-Elektronenmikroskop (Tecnai™; FEI Co., Eindhoven, NL) durchgeführt, welches freundlicherweise von Frau Prof. Pavelka und Mitarbeitern (Abteilung für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung, Institut für Histologie und Embryologie, Zentrum für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Universität Wien) zur Verfügung gestellt wurde. Ein weiterer Vorteil an diesem Elektronenmikroskop war die Möglichkeit der automatisierten Erstellung der tomographischen Aufnahmen durch die Tomographie-Software Xplore3D™ der Fa. FEI Co. (Eindhoven, NL). Dabei wird die Probe automatisch im Mikroskop um einen bestimmten vorher eingegebenen Winkel (Inkrement) gekippt, das Abbild der Probe anschließend jeweils zentriert und erneut fokussiert und jeweils eine Aufnahme pro

Kippwinkel erstellt. An diesem Gerät war eine 1k-Slowscan-CCD-Kamera der Fa. Gatan zur Detektion angebracht. Da die zu untersuchenden Probenstellen mittels TEM-Tomographie bereits im Vorfeld am institutseigenen 120 kV CM 12-TEM identifiziert wurden, war ein zeitaufwendiges Suchen von interessanten Probestellen an dem 200 kV Tecnai-TEM nicht mehr nötig. Eine 1k x 1k-Kamera ist zum Scannen von zahlreichen (Serien-)Schnitten auch nicht optimal geeignet; eine Kamera mit 4fach größerer Fläche wie an dem neuen, am Lehrstuhl (Prof. Witzgall) neu installierten Transmissions-Elektronenmikroskop (JEM-2100F; JEOL Germany GmbH, Eching b. München), mit 4k x 4k Pixel und 64 mm<sup>2</sup> Fläche wird hier in der Zukunft erhebliche Vorteile bringen.

Die TEM-Tomographie-Datensätze wurden mittels einer 3D-Rekonstruktionssoftware (IMOD) verarbeitet, d. h. es wurde jeweils ein fertiges Tomogramm berechnet. Hilfreich war hierbei ein IMOD-Workshop (Johanna Höög, Cindi Schwartz und Julia Cope, Bolder, CO, USA), der im Frühjahr 2010 an der Universität Regensburg abgehalten wurde, da sich das Arbeiten mit diesem umfangreichen Programmpaket mit zahlreichen Optionen für unerfahrene Anwender schwierig gestaltet.

Aus den fertigen 3D-Tomogrammen (s. III.3.3 Abb. 34 – 36) wurden anschließend mittels des wissenschaftlichen 3D-Visualisierungs- und Grafikverarbeitungsprogramms AMIRA® 3D-Modelle der untersuchten Proben (s. III.3.4 Abb. 37 – 39) erstellt. Dafür werden die jeweils gewünschten Strukturen in jeder einzelnen Bildebene des erstellten Tomogramms segmentiert und eingefärbt, d. h. jeder Struktur eine Farbe zugeordnet (vgl. III.3.4). Da es sich hierbei erneut um ein sehr zeitaufwendiges Verfahren handelt, wurden die 3D-Modelle freundlicherweise von studentischen Hilfskräften (Carolin Seebauer, Sebastian Koschade und Niklas Verloh) angefertigt.

Dies soll verdeutlichen, dass auch die Nachbearbeitung und Visualisierung von elektronentomographischen Datensätzen trotz diverser automatisierter Funktionen in dafür vorgesehenen Software-Programmen ein zeitaufwendiges Verfahren ist, das relativ zur eigentlichen Datenaufzeichnung deutlich mehr Zeit benötigt und nur mit Erfahrung, Zeit und leistungsfähiger Peripherie (Hard- und Software) durchführbar ist.

### **1.3 Kryo-Fixierung und Gefriersubstitution**

Für eine Erhaltung im möglichst nativen Zustand wurden die zu untersuchenden Zellen (hier: LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen, s. II.1.6.2) mittels Hochdruckgefrierung kryo-immobilisiert (Möbius, 2009; McDonald, 1999; Dahl and Staehelin, 1989). Dazu wurden die Zellen auf Saphirplättchen kultiviert, welche dann mittels der Hochdruckgefrier-Anlage EM PACT2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit einem Arbeitsdruck von etwa 2100 bar mit flüssigem Stickstoff bei -196°C innerhalb von 10 Millisekunden fixiert wurden. Nach erfolgter Gefriersubstitution, Einbettung der Zellen und Ultramikrotomie in vertikaler Schnittrichtung relativ zu den Zellen, zeigte sich bei deren transmissionselektro-

nenmikroskopischen Analysen wiederholt ein bis dato unerklärliches Phänomen. Die in ihrer Morphologie und Ultrastruktur gut erhaltenen Zellen erschienen mehrmals als abgeflachte Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung war, dass die Saphirplättchen mit den aufgewachsenen Zellen in den dafür vorgesehenen Präparatträgern während des Hochdruckgefrier-Vorgangs nicht ausreichend mechanisch fixiert waren. Zur Abhilfe wurden spezielle Abstandshalter (s. II.4.2.3) angefertigt (Physik-Werkstatt; Universität Regensburg), welche zur Fixierung auf die Saphirplättchen in den jeweiligen Präparathaltern aufgebracht wurden. Damit reduzierte sich zwar die Anzahl der zu untersuchenden Zellen, aber die restlichen Zellen waren in ihrer Gesamtheit nicht mehr abgeflacht und es konnten primäre Zilien detektiert werden.

Ein weiterer Aspekt bei der Kryo-Präparation war die Optimierung des Gefriersubstitutionsprotokolls, bei der striktgenommen die Proben schonend substituiert und gleichzeitig chemisch fixiert werden. In der Literatur existieren zahlreiche unterschiedliche und/oder sich ähnelnde Protokolle zur Substitution des intrazellulären Wassers (McDonald and Webb, 2011; Mühlfeld C., 2010; Sosinsky et al, 2008; Hawes et al., 2007; Giddings 2003; Quintana 1994; von Schack et al., 1993; Humbel and Müller, 1986). Beim Standardprotokoll wird das intrazelluläre amorphe Wasser mit dem organischen Lösungsmittel Aceton ausgetauscht und die intrazellulären Strukturen mit 2% Osmiumtetroxid nachfixiert und kontrastiert. Die Zugabe von Wasser zum Substitutionsmedium soll zur besseren Erhaltung von Zellmembranen beitragen (Buser and Walther, 2008; Giddings, 2003; Walther and Ziegler, 2002). Die Zugabe von Uranylacetat, als ein schwaches Fixativ, verbessert zusätzlich die Ultrastruktur, und verringert das Auswaschen der Lipide im organischen Lösungsmittel (Biel et al., 2003); dazu verbessert es den Kontrast der Zellstrukturen durch Positivkontrastierung bereits während der Gefriersubstitution (Hawes et al., 2007; Giddings et al., 2003). Für spätere immunozytochemische Untersuchungen bietet sich die Verwendung von Uranylacetat als Postfixierungs- und Kontrastierungsmittel insofern an, da dies – im Gegensatz zum starken Oxidationsmittel Osmiumtetroxid – die Antigenität vieler Epitope nicht zerstört (Hawes et al., 2007; McDonald, 1999). Ein weiterer Aspekt ist die Dauer des Gefriersubstitutionsprozesses. Das Standardprotokoll besagt, dass der Prozess des langsamen Aufwärmens über mehrere Stunden/Tage erfolgen soll. Eigene Versuche und weitere Literaturangaben (McDonalds et al, 2011; Hawes et al., 2007) zeigten allerdings, dass eine deutliche Verkürzung der Dauer der einzelnen Schritte (s. II.4.2.4) keinen negativen Einfluss auf die ultrastrukturelle Erhaltung der Proben hat, jedoch die Gesamtdauer der Substitution von 24 bis 72 Stunden auf nur 4 Stunden reduziert werden kann.

#### **1.4 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse**

Wie bereits erwähnt standen am Institut zwei Transmissions-Elektronenmikroskope (CM12, 120 kV, FEI Co., Eindhoven, NL; EM902, 80 kV, Zeiss, Oberkochen) für die elektronenmikroskopischen Analysen zur Verfügung, welche im Wesentlichen für ‚einfache‘ TEM-Einzelaufnahmen, TEM-

Montagen und manuelle TEM-Tomographie-Erstellung geeignet waren. Für die TEM-tomographischen Untersuchungen von Semi-Dünnschnitten ( $\geq 200$  nm) ist, wie oben beschrieben, aufgrund der Verdreifachung der Schichtdicke durch das Kippen der Probe auf  $\pm 70^\circ$  ein Transmissions-Elektronenmikroskop mit höherer Hochspannung (200 – 300 kV) (z. B. JEM-2100[F], 200 kV; JEOL Germany GmbH, Eching b. München) und automatisierter Tomographie-Software (z. B. SerialEM; Boulder Lab, Boulder, CO, USA; oder EM Tools; TVIPS, Gauting; oder TEMography®, JEOL Germany GmbH., Eching b. München) nötig.

Weiterhin würde die Verwendung von energiegefilterten Transmissions-Elektronenmikroskopen Vorteile erbringen, da dadurch spezifische, Element-abhängige Kontraste erzeugt werden können. Dabei wird der unterschiedliche Energieverlust der Elektronen nach dem Probendurchgang genutzt. Dadurch ist es (auch) möglich, die Verteilung bestimmter Elemente in einer Probe, mit lateraler Auflösung von wenigen nm, zu bestimmen. Im Falle der hier gezeigten Ergebnisse von Schwermetall-kontrastierten Proben in Relation zu biologischen, organischen Strukturen würde dies zu einem weiteren Informationsgewinn beitragen (Kapp et al., 2007; Jeanquillaume et al., 1996; Olins et al., 1989). Die Energiefilterung kann unter bestimmten Bedingungen und an modernen, optimierten Mikroskopen die Abbildungsqualität und den Bildkontrast in der Transmissions-Elektronenmikroskopie, auch bei der Untersuchung von dicken biologischen Proben, verbessern (Han et al., 1996; Reimer et al., 1991). Das am Institut installierte EM902 (Zeiss, Oberkochen) verfügt zwar über einen integrierten (Castaing-Henry-)Energiefilter, welcher aber für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht genutzt wurde, insbesondere da hierfür die Hochspannung von 80 kV nicht ausreichend war; letztlich aber auch, weil dieser Filtertyp bei weitem nicht so effektiv ist wie moderne Filter, z. B. vom Omega- und Mandoline-Typ, die an neueren Elektronenmikroskopen installiert sind (z. B. JEM-2200FS mit Omega-Filter; JEOL Germany GmbH, Eching b. München; LIBRA 120 PLUS/LIBRA 200 mit Omega-Filter; Zeiss Oberkochen).

Für dicke biologische Proben ( $\sim 1$   $\mu\text{m}$ ) bringt alternativ zu einem Energiefilter die Möglichkeit zur Raster-Transmissions-Elektronenmikroskopie (STEM: Scanning-Transmission-Electron-Microscopy) (Hohmann-Marriott et al., 2009; Aoyama et al., 2008; Yakushevskaya et al., 2007; Rez, 2003; Leapman et al., 1994; Engel and Colliex, 1993; Colliex et al., 1989) viele Vorteile; v. a. im Bereich der Elektronen-Tomographie. Eine Arbeitsgruppe zeigte kürzlich den Vergleich von konventioneller Elektronentomographie (ohne Energiefilter) an 300 nm-Semi-Dünnschnitten, Most-Probable Energy-Loss Tomographie (MPEL) an 1  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten und axialer Hellfeld-STEM-Tomographie ebenfalls an 1  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten (Sousa et al., 2011). Bei der STEM-Tomography-Methode wird der Konvergenzwinkel des einfallenden Elektronenstrahls minimiert ( $\sim 1 - 2$  mrad), um den Schärfentiefebereich zu erhöhen. Folglich bleibt eine Probe in einem in etwa 1  $\mu\text{m}$  dicken Schnitt in ihrer ganzen Tiefe/Dicke im Fokus (Biskupek et al., 2010; Hohmann-Marriott et al., 2009; Loos et al., 2009; Hyun et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Veröffentlichung (Sousa et al., 2011) zeigen,

dass die räumliche Auflösung und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis während der STEM-Tomographie eines 1 µm-dicken Schnittes mit einem Hellfeld-Detektor ausreichend, um identifizierbare Strukturen wie Mitochondrien, Golgi-Stapel und/oder Insulin Granula zu erkennen und diese auch im Detail für eine 3D-Visualisierung modellierbar sind. Um eventuelle Unebenheiten während der 3D-Rekonstruktion auszugleichen und den Effekt des ‚missing-wedge‘ bei einer Kippserie um eine einzelne Achse (‚single-axis tilt series‘) zu minimieren, wurde eine zweite Kippserie aufgenommen (dual-axis STEM-Tomographie), nachdem die Probe im TEM-Probenhalter umgedreht und zusätzlich um 90° gedreht wurde. Die Methode der STEM-Tomographie ist folglich eine gute Ergänzung zur konventionellen Elektronen-Tomographie, bei der man Tomogramme mit den höchstmöglichen Auflösungen bei Ultradünnschnitten (50 – 100 nm) erhält, und anderen Methoden wie z. B. der FIB/SEM (Focused-ion beam/Scanning electron microscopy) Methode, welche zwar 3D-Rekonstruktionen aus großen Probenvolumina ermöglicht, allerdings bei geringerer Auflösung. Das mittlerweile am Institut installierte Transmissions-Elektronenmikroskop JEM-2100F (JEOL Germany GmbH, Eching b. München) bietet viele der oben diskutierten Möglichkeiten für die weiteren Forschungsinteressen/-untersuchungen.

## **2 Diskussion der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse**

### **2.1 Transport des integralen Membranproteins Polycystin-2**

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung beschäftigte sich mit dem Proteintransport des integralen Membranproteins Polycystin-2 in das, innerhalb des und aus dem primären Zilium. Im Gegensatz zum intraziliären Transport von Proteinen, dem sog. intraflagellaren Transport (IFT; s. I.3.1) (Finetti et al., 2011; Ocbina et al., 2011; Baldari et al., 2010; Sedmak and Wolfrum, 2010; Qin et al., 2005; Rosenbaum and Witman, 2002; Orozco et al., 1999; Kozminski et al., 1993), ist der Transport von (Membran-)Proteinen und Lipiden in das und aus dem Zilium wenig bis gar nicht erforscht. In der Literatur werden mehrere mögliche Transportwege und –mechanismen von integralen Membranproteinen kontrovers diskutiert (Nachury et al., 2010). In den in Abb.7 (s. I.3.2) gezeigten drei Modellen sind mögliche Anordnungen einer postulierten Diffusionsbarriere (Hu et al., 2010) an der Basis eines primären Ziliums bzw. im periziliären Bereich (Reiter and Mostov, 2006) dargestellt. Im Allgemeinen werden Transmembranproteine im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gelangen über den Golgi-Apparat zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Dort werden die Membranproteine modifiziert, anschließend typischerweise in Vesikel verpackt und zum jeweiligen Zielorganell transportiert. Bei den ersten beiden Modellen in Abb. 7 (s. I.3.2) handelt es sich um zwei unterschiedliche Möglichkeiten des gerichteten Proteintransports von Post-Golgi-Vesikeln zur ziliären Basis, d. h. die Membranproteine wandern in Post-Golgi-Vesikeln ver-

packt direkt zum jeweiligen Bestimmungsort, in diesem Fall der Basis des primären Ziliums; während bei der im dritten Modell gezeigten Möglichkeit des Proteintransports die Post-Golgi-Vesikel zuerst zu der Zytoplasmamembran in der Peripherie des primären Ziliums transportiert werden und anschließend durch laterale Diffusion durch die postulierte Diffusionsbarriere in das primäre Zilium gelangen. Allen drei Modellen ist der Transport von in Vesikeln verpackten Membranproteinen gemeinsam.

Der spezifische geometrische Aufbau (s. I.2.1) des primären Ziliums und dessen periziliärer Basis ist jedoch limitierend für die Größe der zu transportierenden Proteine. Wie in I.3.2 beschrieben zeigten Experimente mit Dextran, dass nur Moleküle <10 kDa die postulierte Diffusionsbarriere passieren können (Jensen et al., 2004). Zilienspezifische Membranproteine, wie das in dieser Arbeit untersuchte Polycystin-2 mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, sind allerdings deutlich größer (González et al., 2001; Cai et al., 1999). Diese Tatsache belegt, dass dem Transport von integralen Membranproteinen ins ziliäre Kompartiment spezifische Mechanismen zugrundeliegen.

Durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse werden weitere Hinweise und Belege dafür erhalten, dass der Transport von Polycystin-2 in das primäre Zilium mit Hilfe von Vesikeln erfolgt. Dies zeigen insbesondere die in III.2.2 und III.2.3 beschriebenen Ergebnisse, wobei sich die Transportwege der unterschiedlichen Polycystin-2-Mutanten wiederum unterschiedlich gestalten, was bereits früher (institutsintern) gezeigt wurde (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008; Nauli et al., 2003; Koulou et al., 2002; Scheffers et al., 2002). Im Zuge dieser Arbeit wurden das Voll-längen-Protein von Polycystin-2, die PC2 (1/703)-Deletionsmutante und sog. PC2 (1/703)-Triple-Alanin-Mutanten untersucht (s. I.1.2.3).

#### 2.1.1 Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante

Bei den Untersuchungen mittels der Tetracystein-basierten Detektionsmethode (s. I.4.2 und II.9) bezüglich des Transports der Polycystin-2 (1/703)-Deletionsmutante zeigte sich, wie bereits in früheren Arbeiten (Hoffmeister, 2008), dass diese Version des Proteins vom cis-Golgi (s. III.2.2.1 Abb. 17 a – i) über das Trans-Golgi-Netzwerk aus (s. III.2.2.1 Abb. 16 a – c) bis hin zur somatischen Zytoplasmamembran (s. III.2.2.1 Abb. 18 a – b) transportiert wird. In allen oben genannten Abbildungen sind kontrastierte Vesikel zu erkennen, die die PC2 (1/703)-Deletionsmutante beinhalten, da nur an den Stellen eine Photokonvertierungsreaktion stattfinden konnte, an denen eine spezifische Bindung des ReAsH-Reagenzes an das Tetracystein-Motiv, welches in die Sequenz des deletierten Proteins kloniert wurde, erfolgte. Auch in den Abb. 27 a – h (s. III.2.3) sind kontrastreiche vesikuläre Strukturen zu erkennen. Dabei handelt es sich um Serienschritte einer Zelle, bei der in einer weiter davor oder dahinter gelegenen Schnittebene ebenfalls ein stark kontrastiertes primäres Zilium detektiert wurde (s. III.2.3 Abb. 26 a – f) und somit die Lokalisation der PC2



(1/703)-Deletionsmutante im primären Zilium mittels dieser Methode gezeigt werden konnte. In den Abb. 26 d – f sind drei Serienschritte eines primären Ziliums in höherer Vergrößerung gezeigt, in denen eine starke Kontrastierung des primären Ziliums auszumachen ist. Allerdings ist hier nicht nur, wie vermutet, die ziliäre Plasmamembran markiert, sondern in allen drei Schnitten sind auch die Schaftlumen-Abschnitte des primären Ziliums schwarz gefärbt. In der Abb. 26e lässt eine stärkere Kontrastierung im Zentrum der ‚Übergangszone‘ (s. I.2.1) vom Zellkörper in das primäre Zilium die Vermutung zu, dass das PC2 (1/703)-Protein möglicherweise von der Zytoplasmamembran zu einer ‚Andockstation‘ transportiert wird, von dort in das Lumen des primären Ziliums diffundiert und an der Spitze in die ziliäre Plasmamembran eingebaut wird. Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass es sich bei dem Transport der deletierten Variante des Polycystin-2 um den in I.3.2 beschriebenen Mechanismus handelt, bei dem das zilienspezifische integrale Membranprotein nach der Modifizierung am Trans-Golgi-Netzwerk in Vesikel verpackt zur Zytoplasmamembran transportiert wird, von der es möglicherweise über laterale Diffusion in das primäre Zilium gelangt. Da jedoch, wie bereits beschrieben, nur Proteine  $\leq 10$  kDa die postulierte Diffusionsbarriere passieren können, stellt sich die Frage, wie das PC2 (1/703)-Protein von der Zytoplasmamembran in das primäre Zilium bzw. in dessen Membran gelangt. Im Zuge dieser Arbeit entstandene Ergebnisse nach transmissions-elektronentomographischen Untersuchungen zeigten erstmalig eindeutig vesikuläre Strukturen im Inneren des Basalkörperchens bzw. der ‚Übergangszone‘ zum primären Zilium (s. III.3.3 Abb. 34 – 36). Die in den Abb. 34 - 36 jeweils oben groß dargestellten Aufnahmen zeigen die xy-Ansichten von rekonstruierten 3D-Tomogrammen von Basalstrukturen bzw. den ‚Übergangszonen‘ von primären Zilien, in denen jeweils im Inneren des Mikrotubuli-Achsenskeletts eine vesikuläre Struktur mit jeweils eindeutig zu erkennender Doppelmembran zu sehen ist. Die Zellen wurden hierfür mittels der Hochdruckgefrier-Methode kryo-immobilisiert, schonend gefrier-substituiert und so in einem möglichst nativen Zustand erhalten. Dies erkennt man auch an den gut erhaltenen Doppelmembranen anderer Zellbestandteile, wie Zytoplasmamembran, Mitochondrien und/oder intrazellulärer Vesikel. Die kleinen Abbildungen zeigen jeweils Ausschnitte der Tomogramme der primären Zilien bzw. der vesikulären Strukturen in höheren Vergrößerungen, in denen deren Doppelmembran deutlich zu sehen ist. Diese virtuellen Serienschritte haben jeweils einen Abstand von 6 – 7 nm. Da die von einer Doppelmembran umgebenen Strukturen jeweils in allen Aufnahmen mit einem Gesamtabstand von 24 – 28 nm zu erkennen sind, wird die Hypothese eines intraziliären Vesikels aufgrund einer Größe von mindestens 25 – 30 nm gestützt. In den aus diesen tomographischen Daten und Rekonstruktionen erarbeiteten 3D-Modellen (s. III.3.4 Abb. 37 – 39) werden die Basalstrukturen der primären Zilien veranschaulicht. Dabei wird nochmals deutlich, dass sich die in rot dargestellten Vesikel direkt im Zentrum der basalen Ziliumstrukturen befinden, was vor allem in Abb. 37b und Abb. 39 deutlich zu erkennen ist.

Bei diesen Versuchen wurde keine Tetracystein-basierte Protein-Detektionsmethode angewandt, welche zusätzlich hätte belegen können, dass es sich um - mit dem integralen Membranprotein Polycystin-2 oder dessen Mutanten bepackte - Vesikel handelt. Eine Kombination des Hochdruck-Gefrier-Verfahrens und der Tetracystein-basierten Protein-Detektionsmethode wäre eine sinnvolle Anwendung für weitere Forschungsprojekte, um detailliertere Informationen zum Proteintransport (u. a. von integralen Membranproteinen) zu gewinnen.

### 2.1.2 Polycystin-2-Triple-Alanin-Mutanten

Die Methode der Tetracystein-basierten Proteindetektion wurde auch mit den PC2-Triple-Alanin-Mutanten PC2 (1/703) (KLF→AAA) (AS 572-574) und PC2 (1/703) (KFI→AAA) (AS 575-577) (s. I.1.2.3) durchgeführt; die hier gezeigten Ergebnisse beziehen sich allerdings nur auf die (KFI→AAA)-Mutante (s. III.2.2.2). Die Abb. 20 a – c zeigen in drei aufeinanderfolgenden Serienschnitten einer mit dieser PC2-Mutante transient transfizierten Zelle ein deutlich zu erkennendes Golgi-Feld. Vereinzelt sind auf diesen Aufnahmen kontrastierte vesikuläre Strukturen zu erkennen, wobei diese, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der PC2 (1/703)-Deletionsmutante, ausschließlich im Bereich des cis-Golgi und am endoplasmatischen Retikulum vorkommen. Im Vergleich zu den Abb. 16 und 17 (s. III.2.2.1), welche TEM-Aufnahmen von mit der PC2 (1/703)-Deletionsmutante transfizierten Zellen zeigen, sind in Abb. 20 a – c keine derart kontrastierten Strukturen über dem Trans-Golgi-Netzwerk und/oder markierte Golgi-Zisternen zu erkennen. Diese Ergebnisse wurden in weiteren gleichartigen Experimenten (u. a. auch mit der (KLF→AAA)-Mutante) mehrmals reproduziert (Daten nicht gezeigt). Aus früheren (Lehrstuhlinterne) Arbeiten (Hoffmeister, 2008) ging bereits hervor, dass die PC2-Triple-Alanin-Mutanten einen unterschiedlichen Transportweg zum primären Zilium zurücklegen. So sind diese Protein-Mutanten, im Gegensatz zur PC2 (1/703)-Deletionsmutante, auch nicht an der somatischen Zytoplasmamembran lokalisiert, was die Abb. 21 a und b (s. III.2.2.2) belegen. In diesen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Zytoplasmamembran einer mit dem PC2 (1/703) (KFI→AAA) (AS 575-577), HA, TCM, eGFP-Protein transient transfizierten Zelle nach erfolgter Photokonversion nicht kontrastiert wurde. Die extrazellulär vorliegenden stark kontrastierten Vesikel weisen allerdings daraufhin, dass eine Photooxidations-Reaktion stattgefunden hat. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um bereits aus der Zelle ausgeschleuste akkumulierte mit der PC2-Mutante bepackte Vesikel. Da die PC2-Triple-Alanin-Mutanten, im Gegensatz zur PC2 (1/703)-Deletionsmutante, nicht zur somatischen Plasmamembran transportiert werden, aber ebenfalls im primären Zilium lokalisiert vorkommen (Hoffmeister, 2008; TEM-Daten nicht gezeigt), weist dies auf einen in I.3.2 beschriebenen gerichteten Transport-Mechanismus hin. Allerdings geht aus den bislang erhaltenen Ergebnissen nicht hervor, ob die Vesikel (direkt) an der ‚Übergangszone‘ mit der (peri-)ziliären Membran verschmelzen oder ob es sich um einen andersartigen Transportmechanismus in das primäre Zilium handelt.

### 2.1.3 Vollängen-Polycystin-2

Da es sich bei den zuvor diskutierten Ergebnissen jeweils um Versuche mit verkürzten Polycystin-2-Mutanten handelte und diese auch untereinander unterschiedliche Ergebnisse aufzeigten, kann daraus keineswegs auf das Vollängen-PC2-Protein geschlossen werden. Weiterhin ist auch hier bereits aus früheren (institutseigenen) Arbeiten bekannt, dass es sich bei dem Transportweg in das primäre Zilium wiederum um einen vom PC2-(1/703)-Protein abweichenden Mechanismus handelt (Hoffmeister et al., 2011; Hoffmeister, 2008). Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse dieser Arbeit belegten zwar den Vesikeltransport des Polycystin-2-Vollängen-Proteins (s. III.2.2.3 Abb. 23 a – b), allerdings zeigten sich bei diesen Versuchen neue Erkenntnisse bezüglich der Lokalisation im primären Zilium. Bis dato wurde angenommen, dass das Vollängen-PC2 mit einer für GFP kodierenden Sequenz nicht in das primäre Zilium transloziert wird (Hoffmeister, 2011; Hoffmeister et al., 2008).

Die TEM-Aufnahmen (s. III.2.2.3 Abb. 23 a – b) von mit dem PC2, eGFP, TCM (N), HA-Konstrukt transfizierten und photokonvertierten Zellen zeigen ähnliche Ergebnisse, wie die mit der PC2 (1/703) (KFI→AAA) (AS 575-577), HA, TCM, eGFP-Protein transient transfizierten Zelle (vgl. III.2.2.2 Abb. 20 a – c); es können sowohl am endoplasmatischen Retikulum als auch am cis-Golgi kontrastierte vesikuläre Strukturen beobachtet werden, wohingegen die am Trans-Golgi-Netzwerk vorliegenden Vesikel nicht kontrastiert erscheinen. Ausgehend von diesen Ergebnissen und der bis dato existierenden Annahme, dass das Vollängen-Polycystin-2-Protein nicht zur somatischen Plasmamembran transportiert wird, könnte man auf einen ähnlichen Transportmechanismus wie bei den Polycystin-2-Triple-Alanin-Mutanten spekulieren, bei dem die in Vesikel gepackten Proteine (direkt) an der ‚Übergangszone‘ mit der (peri-)ziliären Membran verschmelzen.

Bisherige Versuche hinsichtlich des Ziliumtransports des Vollängen-Polycystin-2-Proteins, welches mit GFP fusioniert war, zeigten keine Lokalisation dieses Proteins im primären Zilium. Im Zuge der Etablierung der Tetracystein-basierten Protein-Detektionsmethode wurden jedoch mehrere Vollängen-Polycystin-2-Konstrukte getestet, in denen eine zusätzlich zum Tetracystein-Motiv eingebrachte GFP-Sequenz an unterschiedlichen Sequenzabschnitten eingebaut im Plasmid getestet wurden. Mit einer Größe von ~27 kDa (238 Aminosäuren) kann es jedoch bei der Fusion von GFP mit dem Zielprotein zu Konformationsänderungen kommen, die die Struktur und das Verhalten des eigentlichen Proteins beeinflussen (Andresen et al., 2004; Lisenbee et al., 2003). Dabei stellte sich allerdings heraus, dass bei Zellen, die mit einem PC2, eGFP, TCM (N), HA-Konstrukt, bei dem GFP und das TCM-Motiv in den NH<sub>2</sub>-Terminus von Polycystin-2 integriert wurde (im Gegensatz zu der bisherigen Position am COOH-Terminus) transfiziert wurden, ein Transport des Proteins ins primäre Zilium stattfindet (s. VI.1 Abb. 41a [weiße Pfeile]). Da die Expressionsrate bei den bisherigen Transfektionsversuchen nur gering ausfiel (persönliche Mitteilung von Christine Meese), konnten

noch keine eindeutigen TEM-Aufnahmen nach erfolgter Tetracystein-basierter Proteindetektion mittels ReAsH erzielt werden.

Zusammengefasst kann bezüglich des Proteintransports von Polycystin-2 und dessen Mutanten ins primäre Zilium gesagt werden, dass es sich je nach Protein-Variante um unterschiedliche vesikuläre Transportmechanismen handelt. Die PC2 (1/703)-Deletionsmutante scheint vom endoplasmatischen Retikulum über den cis-Golgi zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu gelangen, wo das Protein in Post-Golgi-Vesikel verpackt zur somatischen Plasmamembran transportiert wird; dort verschmelzen die Vesikel mit der Zytoplasmamembran und gelangen über einen bis dato unbekannten Weg in das primäre Zilium. Die PC2 (1/703)-Triple-Alanin-Mutanten und das Volllängen-PC2 sind hingegen intrazellulär nur am cis-Golgi lokalisiert zu finden (mit den bisher vorhandenen ‚Werkzeugen‘); sie werden jedoch nicht über das Trans-Golgi-Netzwerk modifiziert und zur Zytoplasmamembran transportiert. Da beide Protein-Varianten allerdings letztendlich auch im primären Zilium lokalisiert sind, scheint hier ein gerichteter Transportmechanismus zu greifen. Wenn, wie bereits mehrfach erwähnt, die Diffusionsbarriere nur für Moleküle  $\leq 10$  kDa durchlässig ist (s. I.3.2) und dies tatsächlich für alle Proteine in gleicher Weise gilt, dann können die Proteine nicht, wie in den Abb. 7 a und b (s. I.3.2) gezeigten Modellen des gerichteten Transports, in das primäre Zilium gelangen.

Weitere transmissions-elektronentomographische Ergebnisse in dieser Arbeit brachten allerdings eine vollkommen neue Hypothese eines vesikulären Proteintransportes in das primäre Zilium auf. Für diese Versuche wurden Nierenepithelzellen mittels Hochdruckgefrieren in einem möglichst nativen Zustand kryo-immobilisiert und nach weiterer elektronenmikroskopischer Präparation Elektronen-Tomographien von primären Zilien und deren basalen Strukturen angefertigt (s. II.4.2 und II.6). In den daraus rekonstruierten 3D-Tomogrammen (s. III.3.3 Abb. 34 – 36) dieser Basalstrukturen ist eindeutig eine von einer Doppelmembran umgebene vesikuläre Struktur zu erkennen. Bis dato wurde noch kein intraziliärer Vesikeltransport beschrieben, obwohl bereits in frühen Veröffentlichungen darüber spekuliert wurde, da innerhalb des Axonems des primären Ziliums und/oder dessen Basalkörperchen an Vesikel erinnernde Strukturen zu sehen waren (Jensen et al., 2004; Doolin and Birge, 1966; Sotelo and Trujillo-Cenóz, 1958). Durch die schonende Kryo-Präparation – als Kombination von Hochdruck-Gefrieren und Gefriersubstitution – wurden im Zuge dieser Arbeit die Nierenepithelzellen und deren primäre Zilien derart schnell fixiert und schonend entwässert, dass die Zellen und deren (intra-)zelluläre Bestandteile so naturgetreu wie möglich erhalten blieben. Dies ist bei den Ergebnissen in dieser Arbeit vor allem an den sehr gut erhaltenen Doppelmembranen, sowohl der Zyto- und ziliären Plasmamembranen, der Mitochondrien und der intrazellulären Vesikel zu erkennen. So wurde auch erstmalig eine Doppelmembran um eine im Inneren des Ziliums bzw. dessen Basalkörperchen vesikuläre Struktur detektiert, welche gestützt durch die

---

gemessene Größe von ~25 – 30 nm (s. III.3.3), tatsächlich auf ein von einer Lipid-Doppelschicht umgebenes Vesikel schließen lässt.

Durch den Befund, dass sich Vesikel auch im Inneren des primären Ziliums befinden, kann auch eine neue Hypothese eines intraziliären Proteintransports aufgestellt werden, bei der die mit dem (integralen Membran-)Protein bepackten (Trans-Golgi-)Vesikel direkt in das Mikrotubuli-Achsen-skelett des Basalkörperchens, an der sich möglicherweise keine Filtrationsbarriere bezüglich der Partikelgröße befindet, gelangen und anschließend über einen noch zu klärenden Mechanismus ins primäre Zilium wandern, wo es an der Spitze – oder eventuell auch lateral – in die ziliäre Plasmamembran eingebaut wird (Pedersen et al., 2008; van de Weyer, 2008; Qin et al., 2004; Marshall and Rosenbaum, 2001). Weitere Untersuchungen werden in der Zukunft helfen, diese Befunde genauer zu klären. Insbesondere das nicht optimale Markermolekül für Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (hier: ReAsH) ist noch verbesserungswürdig. Hierbei gibt es jedoch eine neue Entwicklung, die eine weitere Option eröffnet: das Labor von Roger Tsien hat kürzlich einen neuen Marker vorgeschlagen, miniSOG (Shu et al, 2011), das vielversprechende Eigenschaften aufweist und auch bei der Untersuchung des intrazellulären Proteintransports am Zilium möglicherweise sehr gut einsetzbar sein dürfte.

## V Zusammenfassung

Anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an renalen Tubulus-Epithelzellen sollten weitere Einblicke in die autosomal-polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) gewonnen werden. Dieser Krankheit liegt eine Fehlfunktion eines antennenartigen Zellorganells, des primären Ziliums, zugrunde, welches u. a. durch Mutationen des integralen Membranproteins Polycystin-2 (PC2) verursacht wird. Dieses Protein ist sowohl im Zytoplasma, als auch intraziliär lokalisiert, was aus früheren fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten bereits bekannt war. Der Transport vom Zellkörper in das primäre Zilium konnte bis dato allerdings noch nicht geklärt werden. Korrelative licht- und transmissionselektronenmikroskopische Versuche sollten dazu beitragen, aus den funktionellen Informationen durch die Fluoreszenz-Mikroskopie kombiniert mit (ultra-)strukturellen Informationen, gewonnen aus der Transmissions-Elektronenmikroskopie, weitere Erkenntnisse zum Transport von Polycystin-2 zu gewinnen. Das Protein kann somit unter dem Fluoreszenzmikroskop *in vivo* detektiert und seine Translokation in der Zelle verfolgt werden; anschließend ermöglicht eine Photooxidation, dasselbe Protein im Elektronenmikroskop mit höherer Auflösung zu analysieren. Dazu wurde eine für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie angewandte Methode der Tetracystein-basierten Proteindetektion mittels ReAsH an den Nierenepithelzellen etabliert und elektronentomographische Untersuchungen für die morphologische und ultrastrukturelle Charakterisierung des primären Ziliums und dessen Basalstruktur von hochdruckgefrorenen Nierenepithelzellen durchgeführt.

Die Tetracystein-basierte Protein-Detektionsmethode wurde mit mehreren vom Polycystin-2 abgeleiteten Protein-Mutanten durchgeführt, welche die Hypothese des Vesikeltransports erneut belegten. Ein Begleit-Ergebnis dieser Untersuchungen war die Translokation des Voll-längen-Polycystin-2 Proteins mit einem integrierten Tetracystein-Motiv und einem zusätzlichen GFP-Tag ins primäre Zilium, was bis dato nicht beobachtet werden konnte.

Im Zuge dieser Arbeit zeigten 3D-Rekonstruktionen und -Visualisierungen von elektronentomographischen Untersuchungen von primären Zilien und dessen Basalkörperchen eindeutig das Vorkommen von Vesikeln im Inneren des Mikrotubuli-Achsen skeletts des Basalkörperchens und der ‚Übergangszone‘ zum primären Zilium. Dies wird einerseits durch die Größenordnung und des Weiteren durch das Vorkommen einer eindeutigen Doppelmembran belegt. Die Kombination der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führt zu der Hypothese eines neuen Modells eines Transportmechanismus von integralen Zilien-assoziierten Membranproteinen.

---

## Abstract

Transmission electron microscopy studies of renal epithelial cells should provide further insights into autosomal polycystic kidney disease (ADPKD). This disease is based on a malfunction of an antenna-like cellular organelle, the primary cilium, caused by mutations of the integral membrane protein Polycystin-2 (PC2). This protein is localized in the cytoplasm as well as in the cilium, which was already known from previous fluorescence microscopy studies. The translocation from the cell body into the primary cilium could not yet been elucidated. Correlative light and transmission electron microscopy experiments should help to combine functional information by fluorescence microscopy with (ultra-)structural information obtained by transmission electron microscopy to gain further insights into the transport of Polycystin-2. The protein and also its translocation in the cell can therefore be examined *in vivo* by fluorescence microscopy and secondly the same protein can be analyzed at a higher resolution by electron microscopy after the photo-oxidation reaction. Therefore, a method applied for correlative light and electron microscopy called Tetracysteine-based protein detection using ReAsH was established with renal epithelial cells and combined with electron-tomographic studies aiming to analyze and characterize the ultrastructure of the primary cilium and its basal structure, using high-pressure frozen kidney epithelial cells.

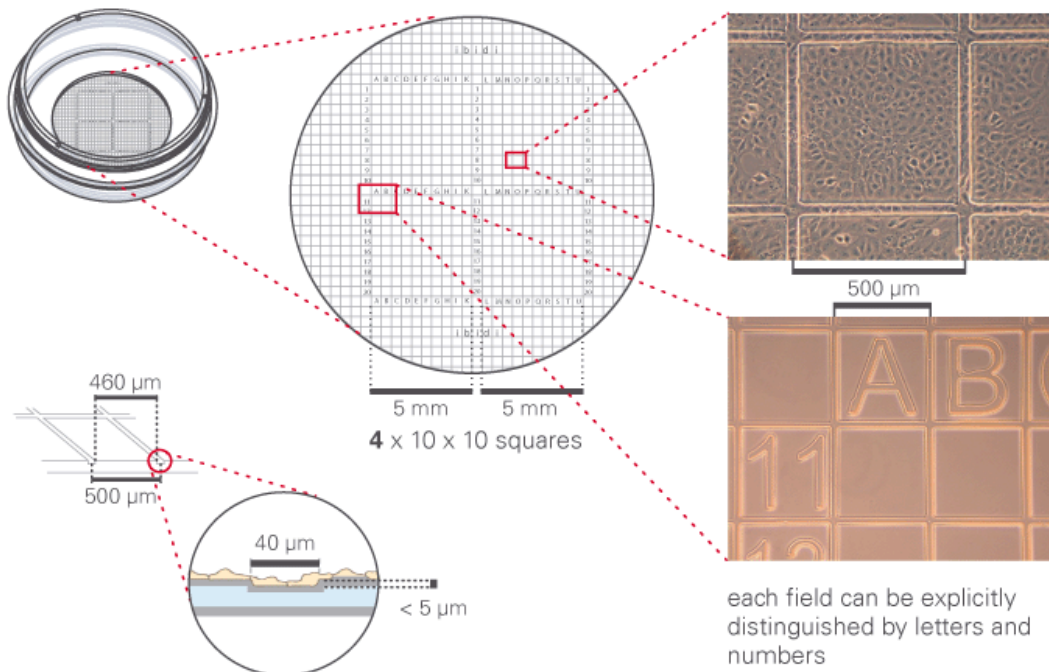
The Tetracysteine-based protein detection method was performed with several protein mutants derived from Polycystin-2, which demonstrated again the hypothesis of vesicular transport. An incidental result of these investigations was the observation that the full-length protein Polycystin-2 with an integrated Tetracysteine-motif and an additional GFP-tag is translocated into the primary cilium – which has not been described so far.

In the course of this work 3D-reconstructions and -visualizations of electron-tomographic studies of primary cilia and its basal body obviously showed the presence of vesicles inside the microtubule axial skeleton of basal bodies and in the transition zone of the primary cilium. The interpretation is based on two facts, the size of the vesicles and that it is delineated by a clear, distinct double-track membrane. The combination of the results obtained in this work leads to the hypothesis of a new model of a transport mechanism of integral ciliar membrane proteins.

## VI Anhang

### 1 Beispiel zur Wiederfindung von ReAsH-photokonvertierten Zellen

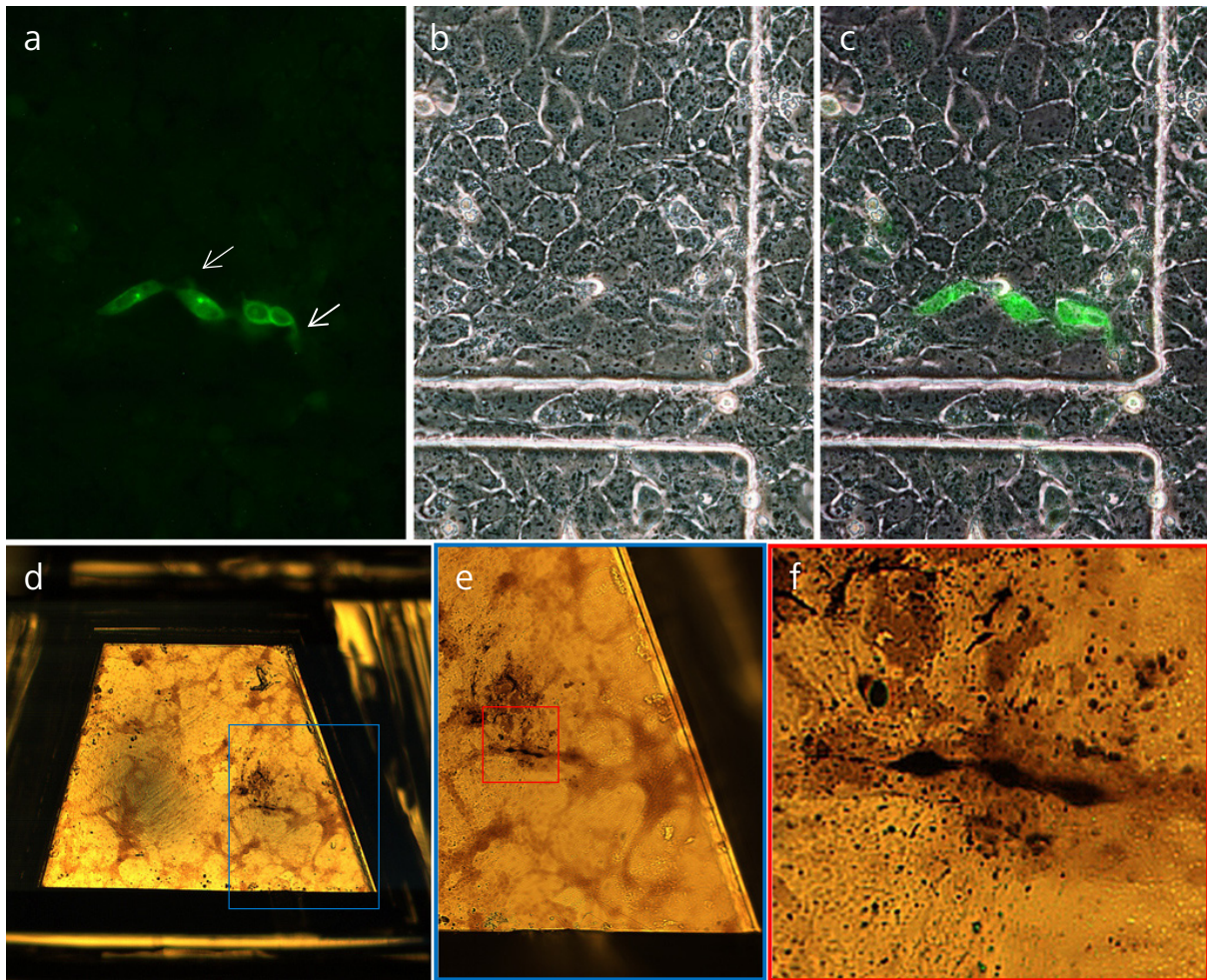
Für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie stehen viele Hilfsmittel zur Verfügung, die das Wiederfinden von ausgesuchten Positionen im Lichtmikroskop für die Elektronenmikroskopie erleichtern. Im Zuge dieser Arbeit wurden spezielle Zellkulturschalen ( $\mu$ -Dish<sup>35mm</sup>, ibidi GmbH, München) verwendet. Deren Boden entspricht zum einen einem Deckglas und weist somit höchste optische Qualität auf; desweiteren ist in diesen Boden ein Koordinatensystem eingeprägt, was das Wiederfinden von Zellen sowohl in der Licht-, als auch in der anschließenden Elektronenmikroskopie erleichtert (s. Abb. 40)



**Abb. 40:** Schematische Darstellung eines  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> (ibidi GmbH, München) mit im Schalenboden integriertem Koordinatensystem.

In diesen  $\mu$ -dishes wurden die jeweilig verwendeten Zellen von der Zellkultur über die *in-vivo*-Proteindetektion mittels ReAsH, die DAB-Photokonvertierung, die Behandlung mit OsO<sub>4</sub> bis hin zur elektronenmikroskopischen Präparation behandelt. Die ausgesuchten Positionen konnten bei jedem Schritt anhand des integrierten Koordinatensystems leicht wiedergefunden werden. Abb. 41 zeigt ein Beispiel eines im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimentes für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie.





**Abb. 41: Beispiel zur Wiederfindung von Zellen bei der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie.** **a)** GFP-Fluoreszenz von LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen, welche mit pcDNA3/PKD2, eGFP, TCM (N), HA transient transfiziert wurden (vgl. III.2.2.3). Die weißen Pfeile deuten grün leuchtende primäre Zilien an lokalisiert ist. **b)** Durchlichtaufnahme an der gleichen Position. **c)** Überinandergelagerte Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen. **d)** Grob trapezförmig-getrimmtes Kunstharzblöckchen. Bräunliches Photokonvertierungs-Reaktionsprodukt zu erkennen (blaue Markierung). **e)** Blöckchen wird auf diese Position feiner zugetrimmt. **f)** höhere Vergrößerung der photokonvertierten Zellen. Struktur vergleichbar mit der, der zuvor fluoreszierenden Zellen.

In Abb. 41a ist die GFP-Fluoreszenz von LLC-PK<sub>1</sub>/PKD2 (1/703), HA, TCM, eGFP-Zellen zu sehen. Abb. 41b zeigt die gleiche Position im Durchlicht und in Abb. 41c sind beide Lichtmikroskopischen Aufnahmen übereinandergelegt. In Abb. 41 b und c ist auch ein Teil eines Quadrates des Koordinatensystems zu erkennen. Mittels dieser Position konnte die später in Kunstharz eingebettete Probe an dieser Stelle ausgesägt, in einen Probenhalter eingespannt und grob zugetrimmt werden. Der Schalenboden wurde für die Ultramikrotomie vorsichtig abgelöst. Dabei besteht die Gefahr, die am Boden aufgewachsenen und fixierten Zellen mitabzulösen. Um dies zu verhindern bzw. die Gefahr zu verringern, wird auf die Unterseite des Bodens ein Tropfen Wasser aufgebracht und an den Ecken des Kunstharz-Blöckchens vorsichtig mit einer dünnen Rasierklinge der Boden vom Kunstharz abgehoben; das Wasser soll dabei das Zersplittern des Deckgläschens verhindern und es hilft zusätzlich dabei die beiden hydrophoben Grenzschichten voneinander zu lösen. Das Ablösen

des Schalenbodens kann je nach Anwender und/oder Probe sowohl vor als auch nach dem groben Zutrimmen auf die zu untersuchende Probenstelle erfolgen. Durch die Photokonvertierung entstand ein bräunliches Reaktionsprodukt, welches im Kunstharzblöckchen zu erkennen war (s. Abb. 41d). Das Blöckchen wurde so klein wie möglich und nötig auf diese Stelle zugetrimmt (s. Abb. 41e). Bei Betrachtung mit einer höheren Vergrößerung (s. Abb. 41f) ist annähernd die gleiche Zellstruktur zu erkennen, wie bei der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (vgl. Abb. 41 a und c). Eine geringfügige Abweichung der Strukturen ist auf die Probenbehandlung zurückzuführen.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

A	Ampère
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung ( <i>Autosomal-dominant Polycystic Kidney Disease</i> )
(A)FS	(Automatische) Gefriersubstitution [(Automatic) Freeze Substitution]
Ala (A)	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
Asn (N)	Asparagin
BAL	Waschpuffer im TC-FIAsh™ TC-ReAsH™ II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kit
BAP	<i>Bacterial Alkaline Phosphatase</i>
BBSom	Bardet-Biedl-Syndrom Proteinkomplex
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinder-Serum-Albumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
C- / COOH-	Kohlenstoff- / Carboxy-Terminus
CMV	Cytomegalo-Virus (CV-1 origin of SV-40)
COS-7	Fibroblasten-Zellen aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze [ <i>Cercopithecus aethiops</i> ]
Cy3	Cyanin-Farbstoff
DAB	Diaminobenzidin
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-dextran
DDM	n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid
DDSA	<i>Dodecenylsuccinic anhydride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMP-30	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure

---

dNTPs (A, C, G, T)	Desoxyribonukleosidtriphosphate (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin)
Dox	Doxyzyklin
EDT	Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et. al.	und andere (lat.: et alii [m], et aliae [f], et alia [n])
FCS/FBS	Fetales Kälberserum ( <i>Fetal Calf/Bovine Serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	<i>Full Length</i> (Volllänge)
FIAsH	<i>Fluorescein Arsenical Hairpin Binder</i>
GA	Glutaraldehyd
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
(e)GFP	( <i>enhanced</i> ) Green Fluorescent Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTE	Glukose-Tris-EDTA
HA	Hämagglutinin (Influenzavirus A)
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPF	Hochdruckgefrieren ( <i>High pressure freezing</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
IFT	Intraflagellarer Transport
Ile (I)	Isoleucin
Kann	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
Kif(3A/B)	Kinesin Superfamily Protein (3A/B)
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Leu (L)	Leucin
LLC-PK <sub>1</sub> / LtTA-2,22	Renale Tubulus-Epithelzellen aus dem Schwein
Lys (K)	Lysin
MDCK	<i>Madine Darby Canine Kidney</i>
mIMCD	<i>mouse Inner Medullary Collecting Duct</i>
MM	Magermilch
MNA	<i>Methyl-5-norbornene-2,3-dicarboxylic anhydride</i>
MW	Molekulargewicht
N- / NH <sub>2</sub> -	Amino-Terminus
NA	numerische Apertur
OD	optische Dichte

---

OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PC(1/2)	Polycystin (-1/2) Protein
PEG	Polyethylenglycol
(P)FA	(Para)Formaldehyd
Ph	<i>pondus hydrogenii</i> (Wasserstoff-Exponent)
Phe (F)	Phenylalanin
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung ( <i>Polycystic Kidney Disease</i> )
Pro (P)	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ReAsH	<i>Resorufin Arsenical Hairpin Binder</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
T <sub>schmelz</sub>	optimale Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCM	Tetracystein-Motiv
(T)EM	(Transmissions-) Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRPP	<i>Transient Receptor Potential</i> Protein (Polycystin-Unterfamilie)
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
U	<i>Unit</i>
UAc	Uranylacetat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen

### 3 Ordnerstruktur der Begleit-CD

Folgende Zusammenstellung zeigt sämtliche im Rahmen dieser Arbeit erstellten 3D-Rekonstruktionen und 3D-Visualisierungen. Die in Abb. 42 gezeigte Ordnerstruktur ermöglicht einen Überblick über die auf der Begleit-CD zu findenden Daten.

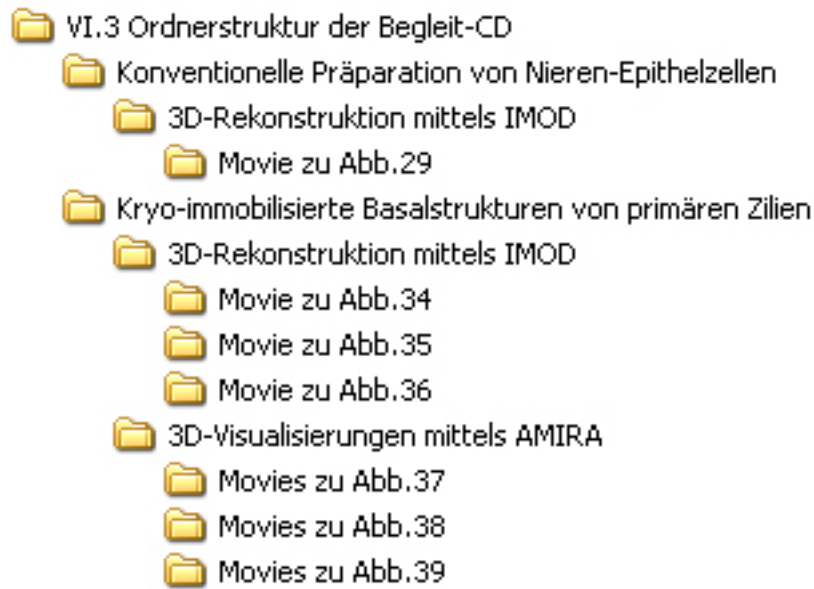


Abbildung 42: Ordnerstruktur der Begleit-CD.

## VII Literaturverzeichnis

- Abraham A., Turgut-Neary E., Omar H., Massaeli H., Mesaeli N. **(2010)** Calreticulin mediated control of polycystin-2 expression. *Qatar Foundation Annual Research Forum Proceedings 2010* BMP56, doi: 10.5339/qfarf.2010.bmps6
- Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J. and Tsien R.Y. **(2002)** New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications. *J Am Chem Soc* 124(21): 6063-6076
- Adams S.R. and Tsien R.Y. **(2008)** Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FIAsh-EDT2 and ReAsh-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins. *Nat Protoc* 3(9): 1527-1534
- Afzelius B.A. **(1976)** A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193(4250): 317-319
- Agronskaia A.V., Valentijn J.A., van Driel L.F., Schneijdenberg C.T., Humbel B.M., van Bergen en Henegouwen P.M., Verkleij A.J., Koster a.J., Gerritsen H.C. **(2008)** Integrated fluorescence and transmission electron microscopy. *J Struct Biol* 164(2): 183-189
- Alieva I.B. and Vorobjev I.A. **(2004)** Vertebrate primary cilia: a sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a "sleeping beauty" in cultured cells? *Cell Biol Int* 28(2): 139-150
- Anderson R.G. **(1972)** The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol* 54(2): 246-265
- Anderson C.T., Castillo A.B., Brugmann S.A., Helms J.A., Jacobs C.R., Stearns T. **(2008)** Primary cilia: cellular sensors for the skeleton. *Anat Rec (Hoboken)* 291(9): 1074-1078
- Andresen M., Schmitz-Salue R. and Jakobs S. **(2004)** Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the Significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell* 15(12): 5616-5622
- Andrews P.M. and Porter K.R. **(1974)** A scanning electron microscopic study of the nephron. *Am J Anat* 140(1): 81-115
- Aoyama K., Takagi T., Hirase A., Miyazawa A. **(2008)** STEM tomography for thick biological specimens. *Ultramicroscopy* 109(1): 70-80
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. **(2007)** CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: *John Wiley & Sons, New York (USA)*
- Badano J.L., Mitsuma N., Beales P.L., Katsanis N. **(2006)** The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 125-148
- Baldari C.T. and Rosenbaum J. **(2010)** Intraflagellar transport: it's not just for cilia anymore. *Curr Opin Cell Biol* 22(1): 75-80
- Bang B.H. and Bang F.B. **(1957)** Graphic reconstruction of the third dimension from serial electron microphotographs. *J Ultrastruct Res* 1(2): 138-139
- Baumeister W., Grimm R. and Walz J. **(1999)** Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol* 9(2): 81-85
- Benzing T. and Walz G. **(2006)** Cilium-generated signaling: a cellular GPS? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(3): 245-249
- Berryman M.A., Rodewald R.D. **(1990)** An enhanced method for post-embedding immunocytochemical staining which preserves cell membranes. *J Histochem Cytochem* 38: 159-170
- Bettencourt-Dias M. and Glover D.M. **(2007)** Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 451-463

- Bettencourt-Dias M. and Carvalho-Santos Z. (2008) Double life of centrioles: CP110 in the spotlight. *Trends Cell Biol* 18(1): 8-11
- Biel S.S., Kawaschinski K., Wittern K.P., Hintze U., Wepf R. (2003) From tissue to cellular ultrastructure: closing the gap between micro- and nanostructural imaging. *J Microsc* 212(1): 91-99
- Bisgrove B.W. and Yost H.J. (2006) The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development* 133(21): 4131-4143
- Biskupek J., Leschner J., Walther P., Kaiser U. (2010) Optimization of STEM tomography acquisition – A comparison of convergent beam and parallel beam STEM tomography. *Ultra-microscopy* 110(9): 1231-1237
- Bleck C.K., Merz A., Gutierrez M.G., Walther P., Dubochet J., Zuber B., Griffiths G. (2010) Comparison of different methods for thin section EM analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Microsc* 237(1): 23-38
- Bogdanova N., Dworniczak B., Dragova D., Todorov V., Dimitrakov D., Kalinov K., Hallmayr J., Horst J., Kalaydjieva L. (1995) Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Bulgaria. *Hum Genet* 95(6): 645-50
- Boucher and Sandford (2004) Autosomal polycystic kidney disease (ADPKD, MIM 173900, *PKD1* and *PKD2* genes, protein products known as polycystin-1 and polycystin-2). *Eur J Hum Genet* 12(5): 347-54
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Buchholz B. (2004) Funktionelle Interaktion von Polycystin 2 und TRPV4. (Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br.)
- Buser C. und Walther P. (2008) Freeze-substitution: the addition of water to polar solvents enhances the retention of structure and acts at temperatures around -60°C. *J Microsc* 230(2): 268-277
- Cai Y., Jia T., Lam S.K., Ding Y., Gao C., San M.W., Pimpl P., Jiang L. (2011) Multiple cytosolic and transmembrane determinants are required for the trafficking of SCAMP1 via an ER-Golgi-TGN-PM pathway. *Plant J* 65(6): 882-896
- Cai Y., Maeda Y., Cedzich A., Torres V.E., Wu G., Hayashi T., Mochizuki T., Park J.H., Witzgall R., Somlo S. (1999) Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem* 274(40): 28557-28565
- Cano D.A., Murcia N.S., Pazour G.J., Hebrok M. (2004) Orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Development* 131(14): 3457-3467
- Carvalho-Santos Z., Machado P., Branco P., Tavares-Cadete F., Rodrigues-Martins A., Pereira-Leal J.B., Bettencourt-Dias M. (2010) Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J Cell Sci* 123(Pt 9): 1414-1426
- Cedzich A. (2000) Charakterisierung des polyzystischen Nierenproteins *PKD2* und seiner L703-Deletionsmutante in permanenten Zelllinien (Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktor scientiarum humanarum der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg)
- Chargaff E. and Davidson J.N. (1955) *The Nucleic Acids*, Academic Press, New York, Vol. II: 9-10
- Charron A.J., Nakamura S., Bacallao R., Wandinger-Ness A. (2000) Compromised cytoarchitecture and polarized trafficking in autosomal dominant polycystic kidney disease cells. *J Cell Biol* 149(1): 111-124

- Christensen S.T., Pedersen L.B., Schneider L., Satir P. (2005) Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic* 8(2): 97-109
- Chung C.T., Niemala S.L. and Miller R.H. (1989) One step-preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(7): 2172-2175
- Clapham D.E., Julius D., Montell C., Schultz G. (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57(4): 427-450
- Cole D.G., Diener D.R., Himelblau A.L., Beech P.L., Fuster J.C., Rosenbaum J.L. (1998) *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport: IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol* 141(4): 993-1008
- Colliex C., Mory C., Olins A.L., Olins D.E., Tencé M. (1989) Energy filtered STEM imaging of biological sections. *J Microsc* 153(1): 1-21
- Consugar M., Rossetti S., Anderson S., DeAlmedia E., Cunningham J.M., Torres V.E., Harris P.C. (2005) *PKD3* revisited with improved *PKD1* and *PKD2* haplotyping and mutation
- Currie A.R. and Wheatley D.N. (1966) Cilia of a distinctive structure (9C 0) in endocrine and other tissues. *Postgrad Med J* 42: 403-408
- Dahl R. and Staehelin L.A. (1989) High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J Electron Microsc Tech* 13(3): 165-174
- Daoust M.C., Reynolds D.M., Bichet D.G., Somlo S. (1995) Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25(3): 733-736
- Davenport J.R. and Yoder B.K. (2005) An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1159-F1169
- Deane J.A., Cole D.G., Seeley E.S., Diener D.R., Rosenbaum J.L. (2001) Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr Biol* 11(20): 1586-1590
- Deretic D. and Papermaster D.S. (1991) Polarized sorting of rhodopsin on post-Golgi membranes I frog retinal photoreceptor cells. *J Cell Biol* 113(6):1281-1293
- Dong Y., Skoultchi A.I. and Pollard J.W. (1993) Efficient DNA transfection of quiescent mammalian cells using poly-L-ornithine. *Nucleic Acids Research*, 21(3): 771-772
- Doolin P.F. and Birge W.J. (1966) Ultrastructural organization of cilia and basal bodies of the epithelium of the choroid plexus in the chick embryo. *J Cell Biol* 29(2):333-345
- Dutcher S.K. (2003) Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* 4(7): 443-451
- Dute R. and Kung C. (1978) Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in *Paramecium tetraurelia*. *J Cell Biol* 78(2): 451-464
- Eggenchwiler J.T. and Anderson K.V. (2007) Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 345-373
- Ejsing C.S., Sampaio J.L., Surendranath V., Duchoslav E., Ekroos K., Klemm R.W., Simons K., Shevchenko A. (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2136-2141
- Emmer B.T., Maric D. and Engman D.M. (2010) Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. *J Cell Sci* 123(Pt 4): 529-536
- Emmons S.W. and Somlo S. (1999) Signal transduction: Mating, channels and kidney cysts. *Nature* 401(6751): 339-340



- Engel A. and Colliex C. (1993) Application of scanning transmission electron microscopy to the study of biological structure. *Curr Opin Biotechnol* 4(4): 403-411
- Farr G.A., Hull M., Mellman I., Caplan M.J. (2009) Membrane proteins follow multiple pathways to the basolateral cell surface in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 186(2): 269-282
- Fawcett D.W. and Porter K.R. (1954) A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J Morphol* 94(2): 221-281
- Feder N. and Sidman R.L. (1985) Methods and principles of fixation by freeze-substitution. *J Biophys Biochem Cytol* 4(5): 593-600
- Fick G.M. and Gabow P.A. (1994) Hereditary and acquired cystic disease of the kidney. *Kidney International* 46: 951-964
- Field J., Nikawa J.I., Broek D., MacDonald B., Rodgers L., Wilson I.A., Lerner R.A. and Wigler M. (1988) Purification of a RAS-Responsive Adenylyl Cyclase Complex from *Saccharomyces Cerevisiae* by Use of an Epitope Addition Method. *Mol Cell Biol*, 8(5): 2159-2165
- Finetti F., Paccani S.R., Rosenbaum J., Baldari C.T. (2011) Intraflagellar transport: a new player at the immune synapse. *Trends Immunol* 32(4): 139-145
- Fliegauf M., Benzing T. and Omran H. (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 880-893
- Follit J.A., Tuft R.A., Fogarty K.E., Pazour G.J. (2006) The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol Biol Cell* 17(9): 3781-3792
- Francis S.S., Sfakianos J. Lo B., Mellman I. (2011) A hierarchy of signals regulates entry of membrane proteins into the ciliary membrane domain in epithelial cells. *J Cell Biol* 193(1): 219-233
- Frank J. (1992) Electron tomography. Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope (Mathematical Concepts and Methods in Science and Engineering). *Plenum Press*, New York
- Franz A., Maass K. and Seedorf M. (2007) A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of Ist2 from the yeast ER to the plasma membrane. *FEBS Letters* 581(3): 401-405
- Friedmann I. and Bird E.S. (1971) Ciliary structure, ciliogenesis, microvilli. (Electron microscopy of the mucosa of the upper respiratory tract). *Laryngoscope* 81(11): 1852-1868
- Fuscaldo K.E. and Jones H.H. (1959) A method for the reconstruction of three-dimensional models from electron micrographs of serial sections. *J Ultrastruct Res* 3: 1-10
- Gaietta G., Deerinck T.J., Adams S.R., Bouwer J., Tour O., Laird D.W., Sosinsky G.E., Tsien R.Y., Ellisman M.H. (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296: 503-507
- Gaietta G.M., Giepmans B.N.G., Deerinck T.J., Smith W.B., Ngan L., Llopis J., Adams S.R., Tsien R.Y. and Ellisman M.H. (2006) Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy. *PNAS*, 103(47): 17777-17782
- Gaietta G.M., Deerinck T.J. and Ellisman M.H. (2011) Correlated Live Cell Light and Electron Microscopy Using Tetracysteine Tags and Biarsenicals. *CSH Protocols* (in Druck), doi 10.1101/pdb.pdb.top94
- Gaietta G.M., Deerinck T.J. and Ellisman M.H. (2011) Labeling Tetracysteine-tagged Proteins with Biarsenical Dyes for Live Cell Imaging. *CSH Protocols* (in Druck), doi 10.1101/pdb.prot5547

- Gaietta G.M., Deerinck T.J. and Ellisman M.H. (2011) Fluorescence Photoconversion of Biarsenical-Labeled Cells for Correlated Electron Microscopy (EM). *CSH Protocols* (in Druck), doi 10.1101/pdb.prot5548
- Gallagher A.R., Cedzich A., Gretz N., Somlo S., Witzgall R. (2000) The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4017-4022
- Gallagher A.R., Hidaka S., Gretz N., Witzgall R. (2002) Molecular basis of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Cell Mol Life Sci* 59(4): 682-693
- Gardner K.D. Jr., Glew R.H., Evan A.P., McAteer J.A., Bernstein J. (1994) Why renal cysts grow. *Am J Physiol* 266(3 Pt2): F353-359
- Geimer S. and Melkonian M. (2004) The ultrastructure of the *Chlamydomonas reinhardtii* basal apparatus: identification of an early marker of radial asymmetry inherent in the basal body. *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2663-2674
- Geng L., Okuhara D., Yu Z., Tian X., Cai Y., Shibasaki S and Somlo S. (2006) Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci* 119(7): 1383-95
- Gerdes J.M., Davis E.E., Katsanis N. (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* 137(1): 32-45
- Gibbons I.R. and Grimstone A.V. (1960) On Flagellar Structure in Certain Flagellates. *J Biophys Biochem Cytol* 7(4): 697-716
- Giddings T.H. (2003) Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples. *J Microsc* 212(1): 53-61
- Gifford J.L., Walsh M.P. and Vogel H.J. (2007) Structures and metal-ion binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405: 199-221
- Gilula N.B. and Satir P. (1972) The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J Cell Biol* 53(2): 494-509
- Glauert A.M. (1975) Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: *Practical methods in electron microscopy*. Glauert A.M. (ed.) Vol. 3, Elsevier, Amsterdam
- Glebov O.O., Bright N.A., Nichols B.J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytotic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8(1): 46-54
- Goetz S.C. and Anderson K.V. (2010) The primary cilium: a signaling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11(5): 331-344
- González-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano A.E., Zotta E., Batelli M., Harris P.C., Reisin I.L., Arnaout M.A., Cantiello H.F. (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1182-1187
- Gossen M. and Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547-5551
- Grabenbauer M., Geerts W.J., Fernandez-Rodriguez J., Hoenger A., Koster A.J., Nilsson T. (2005) Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation. *Nat Methods* 2(11): 857-862
- Graham L.L. and Beveridge T.J. (1990) Evaluation of freeze-substitution and conventional embedding protocols for routine electron microscopic processing of eubacteria. *J Bacteriol* 172(4): 2141-2149
- Grantham J.J. (1993) Fluid secretion, cellular proliferation, and the pathogenesis of renal epithelial cysts. *J Am Soc Nephrol* 3(12): 1841-57

- Grantham J.J., Ye M., Gattone V.H. 2nd, Sullivan L.P. **(1995)** In vitro fluid secretion by epithelium from polycystic kidneys. *J Clin Invest* 95(1): 195-202
- Grantham J.J. **(2001)** Polycystic kidney disease: From the bedside to the gene back. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 10: 533-542
- Grantham J.J., Torres V.E., Chapman A.B., Guay-Woodford L.M., Bae K.T., King B.F. Jr., Wetzel L.H., BAumgarten D.A., Kenney P.J., Harris P.C., Klahr S., Bennett W.M., Hirschman G.N., Meyers C.M., Zhang X., Zhu F., Miller J.P. **(2006)** Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 354(20): 2122-2130
- Griffin B.A., Adams S.R. and Tsien R.Y. **(1998)** Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* 281(5374): 269-272
- Griffith G., Burke B., Lucocq J. **(1993)** Fine structure immunocytochemistry. Springer-Verlag, Berlin, 459 Seiten
- Grimm R., Singh H. Rachel R., Typke D., Zillig W., Baumeister W. **(1998)** Electron-tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophys J* 74(2 Pt 1): 1031-1042
- Hagiwara H., Aoki T. and Fujimoto T. **(1997)** Ultrastructural observation on 'transitional tubules' in human oviductal ciliogenic cells. *J Anat* 191(Pt 2): 285-290
- Han K.F., Gubbens A.J., Sedat J.W., Agard D.A. **(1996)** Optimal strategies for imaging thick biological specimens: exit wavefront reconstruction and energy-filtered imaging. *J Microsc* 183(2): 124-132
- Hanahan D. **(1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hao L. and Scholey J.M. **(2009)** Intraflagellar transport at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 7): 889-892
- Harris K.M., Perry E., Bourne J., Feinberg M., Ostroff L., Hurlburt J. **(2006)** Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy. *J Neurosci* 26(47): 12101-12103
- Harris P.C. **(1999)** Autosomal dominant polycystic kidney disease: clues to pathogenesis. *Hum Mol Gen* 8: 1861-1866
- de Harven E. and Bernhard W. **(1956)** Etude au microscope electronique de l'ultrastructure du centriole chez les vertébrés. *Cell Tissue Res* 45(3): 378-398
- Hawes P., Netherton C.L., Mueller M., Wileman T., Monaghan P. **(2007)** Rapid-freeze-substitution preserves membranes in high-pressure frozen tissue culture cells. *J Microsc* 226(2): 182-189
- Hayat M.A. **(1970)** Principles and techniques of electron microscopy. *Biological applications*. van Nostrand R, Vol. 1, New York
- Haycraft C.J., Zhang Q., Song B., Jackson W.S., Detloff P.J., Serra R., Yoder B.K. **(2007)** Intraflagellar transport is essential for endochronal bone formation. *Development* 134(2): 307-316
- van der Heiden K., Hierck B.P., Krams R., de Chrom R., Cheng C., Baiker M., Pourguie M.J., Alkemade F.E., DeRuiter M.C., Gittenberger-de Groot A.C., Poelmann R.E. **(2008)** Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 196(2): 542-550
- Herbst M.H.G. **(2009)** Untersuchungen zur Funktion von PKD2 auf die Proliferation und die ziliäre Flussantwort durch induzierbare Proteindepletion in renalen Epithelzellen. Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades [Dr. med.] der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
- Hidaka S., Könecke V., Osten L., Witzgall R. **(2004)** PIGEA-14. a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J Biol Chem* 279(33): 35009-35016

- Hildebrandt F., Benzing T., Katsanis N. (2011) Ciliopathies. *N Engl J Med* 364(16): 1533-1543
- Hoffmann C., Gaietta G., Bunemann M., Adams S.R., Oberdorff-Maass S., Behr B., Vilardaga J.P., Tsien R.Y., Ellisman M.H. and Lohse M.J. (2005) A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2(3): 171-176
- Hoffmeister H.A. (2008) Struktur- und Funktionsanalyse von Polycystin-2 (Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften [Dr. rer. nat.] der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg)
- Hoffmeister H., Gallagher A.R., Rasche A., Witzgall R. (2010) The human polycystin-2 protein represents an integral membrane protein with six membrane-spanning domains and intracellular N- and C-termini. *Biochem J* 433(2): 285-294
- Hoffmeister H., Babinger K., Gürster S., Cedzich A., Meese C., Schadendorf K., Osten L., de Vries U., Rasche A., Witzgall R. (2011) Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane. *J Cell Biol* 192(4): 631-645
- Hohmann-Marriott M.F., Sousa A.A., Azari A.A., Glushakova S., Zhang G., Zimmerberg J., Leapman R.D. (2009) Nanoscale 3D cellular imaging by axial scanning transmission electron tomography. *Nat. Methods* 6: 729-731
- Höög J.L. and Antony C. (2007) Whole-cell investigation of microtubule cytoskeleton architecture by electron tomography. *Methods Cell Biol* 79: 145-167
- Horowitz R.A., Giannasca P.J. Woodcock C.L. (1990) Ultrastructural preservation of nuclei and chromatin: improvement with low-temperature methods. *J Microsc* 157: 205-224
- Hu Q., Milenkovic L., Jin H., Scott M.P., Nachury M.V., Spiliotis E.T., Nelson W.J. (2010) A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* 329(5990): 436-439
- Huangfu D., Liu A., Rakeman A.S., Murcia N.S., Niswander L., Anderson K.V. (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426(6962): 83-87
- Hughes J., Ward C.J., Peral B., Aspinwall R., Clark K., San Millán J.L., Gamble V., Harris P.C. (1995) The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 10(2): 151-160
- Humbel B., Marti T., Müller M. (1983) Improved structural preservation by combining freeze substitution and low temperature embedding. In: *Beitr Elektronenmikroskop.* Pfefferkom G (ed.), Vol. 16, Direktabb Oberfl., Antwerpen
- Humbel B.M. and Müller M. (1986) Freeze substitution and low temperature embedding. *The Science of Biological Specimen Preparation*, 1985 (ed. by M. Müller, R.P. Becker, A. Boyde & J.J. Wolosewick): 175-183: SEM Inc., Amf O'Hare, Illinois
- Humbel B.M., Schwarz H. (1989) Freeze-substitution for immunocytochemistry. In: *Immunogold labeling in cell biology.* Verkleij A.J. and Leunissen J.L.M. (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 116-134
- Hunnicut G.R., Kosfisz M.G. and Snell W.J. (1990) Cell body and flagellar agglutinins in *Chlamydomonas reinhardtii*: the cell body plasma membrane is a reservoir for agglutinins whose migration to the flagella is regulated by a functional barrier. *J Cell Biol* 111(4): 1605-1616
- Hunziker E.B., Herrmann W., Schenk R.K., Müller M., Moor H. (1984) Cartilage ultrastructure after high pressure freezing, freeze substitution, and low temperature embedding. *J Cell Biol* 98: 267-276
- Hyun J.K., Ercius P., Muller D.A. (2008) Beam spreading and spatial resolution in thick organic specimens. *Ultramicroscopy* 109(1): 1-7

- Igarashi P. and Somlo S. (2002) Genetics and Pathogenesis of Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 2384-2398
- Insinna C. and Besharse J.C. (2008) Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors. *Dev Dyn* 237(8): 1982-1992
- Jakobs S., Schauss A.C., Hell S.W. (2003) Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen. *FEBS Lett.* 554(1-2): 194-200
- Jeanquillaume C., Tencé M., Zhang L., Ballongue P. (1996) Practical aspects of electron energy loss spectroscopy (EELS) in biology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42(3): 439-450
- Jensen P.V., Poole C.A., Mc Glashan S.R., Marko M., Issa Z.I., Vujcich K.V., Bowser S.S. (2004) Ultrastructural, tomographic and confocal imaging of the chondrocyte primary cilium in situ. *Cell Biol Int* 28(2): 101-110
- Jin H. and Nachury M.V. (2009) The BBSome. *Curr Biol* 19(12): R472-R473
- Johnson K.A. and Rosenbaum J.L. (1992) Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 119(6): 1605-1611
- Johnston P.V. Roots BI (1967) Fixation of the central nervous system by perfusion with aldehydes and its effect on the extracellular space as seen by electron microscopy. *J Cell Sci*, 2: 377
- Jones C., Roper V.C., Foucher I., Qian D., Banzis B., Petit C., Yoder B.K., Chen P. (2008) Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet* 40(1): 69-77
- Jüschke C., Wächter A., Schwappach B. and Seedorf M. (2005) SEC 18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J Cell Biol* 169(4): 613-622
- Jurczyk A., Gromley A., Redick S., San Agustin J., Witman G., Pazour G.J., Peters D.J., Doxsey S. (2004) Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J Cell Biol* 166(5): 637-643
- Kapp N., Studer D., Gehr P., Geiser M. (2007) Electron energy-loss spectroscopy as a tool for elemental analysis in biological specimens. *Methods Mol Biol* 369: 431-447
- Kellogg D.R., Field C.M., Alberts B.M. (1989) Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle, and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J Cell Biol* 109(Pt6): 2977-2991
- Kimberling W.J., Kumar S., Gabow P.A., Kenyon J.B., Connolly C.J. and Somlo S. (1993) Autosomal dominant polycystic kidney disease: Localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* 18: 467-472
- Klemm R.W., Eysing C.S., Surma M.A., Kaiser H.J., Gerl M.J., Sampaio J.L., de Robillard Q., Ferguson C., Proszynski T.J., Shevchenko A., Simons K. (2009) Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 185(4): 601-612
- Kobayashi T. and Dynlacht B.D. (2011) Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol* 193(3): 435-444
- Köttgen M., Benzing T., Simmen T., Tauber R., Buchholz B., Feliciangeli S., Huber T.B., Schermer B., Kramer-Zucker A., Höpker K., Simmen K.C., Tschucke C.C., Sandford R., Kim E., Thomas G. and Walz G. (2005) Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 24: 705-716
- Koulen P., Cai Y., Geng L., Maeda Y., Nishimura S., Witzgall R., Ehrlich B.E. and Somlo S. (2002) Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nature Cell Biol* 4: 191-197

- Koyama E., Young B., Nagayama M., Shibukawa Y., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., Maeda Y., Lanske B., Song B., Serra R., Pacifici M. (2007) Conditional Kif3a ablation causes abnormal hedgehog signaling topography, growth plate dysfunction, and excessive bone and cartilage formation during mouse skeletogenesis. *Development* 134(11): 2159-2169
- Kozminski K.G., Johnson K.A., Forscher P., Rosenbaum J.L. (1993) A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5519-5523
- Kremer J.R., Mastronarde D.N. and McIntosh J.R. (1996) Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *J Struct Biol* 116: 71-76
- Kuhara A., Okumura M., Kimata T., Tanizawa Y., Takano R., Kimura K.D., Inada H., Matsumoto K., Mori I. (2008) Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science* 320(5877): 803-807
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Leapman R.D., Sun S.Q., Hunt J.A., Andrews S.B. (1994) Biological electron energy loss spectroscopy in the field-emission scanning transmission electron microscope. *Scanning Microsc Suppl*, 8:254-258; discussion: 258-259
- Leis a., Rockel B., Andrees L., Baumeister W. (2009) Visualizing cells at the nanoscale. *Trends Biochem Sci* 34(2): 60-70
- Leroux M.R. (2007) Taking vesicular transport to the cilium. *Cell* 129(6): 1041-1043
- Liang G., Li Q., Tang Y., Kokame K., Kikuchi T., Wu G., Chen X.Z. (2008) Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet* 17(8): 1109-1119
- Lichtenstein A., Gaietta G.M., Deerinck T.J., Crum J., Sosinsky G.E., Beyer E.C., Berthoud V.M. (2009) The cytoplasmic accumulations of the cataract-associated mutant, Connexin50P-88S, are long-lived and form in the endoplasmic reticulum. *Exp Eye Res* 88: 600-609
- Lisenbee C.S., Karnik S.K. and Trelease R.N. (2003) Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic* 4(7): 491-501
- Loktev A.V., Zhang Q., Beck J.S., Searby C.C., Scheetz T.E., Bazan J.F., Slusarski D.C., Sheffield V.C., Jackson P.K., Nachury M.V. (2008) A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell* 15(6): 854-865
- van Lookeren Campagne M., Oesterreicher A.B., van der Krift T.P., Gispen W.H., Verkleij A.J. (1991) Freeze-substitution and Lowicryl HM20 embedding of fixed rat brain: suitability for immunogold ultrastructural localization of neural antigens. *J Histochem Cytochem* 39: 1267-1279
- Loos J., Sourty E., Lu K., Freitag B., Tang D., Wall D. (2009) Electron tomography on micrometer-thick specimens with nanometer resolution. *Nano Lett* 9(4): 1704-1708
- Lucić V., Förster F. and Baumeister W. (2005) Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem* 74: 833-865
- Luft J.H. (1961) Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods. *J Cell Biol* 9(2): 409-414
- Luo Y., Vassilev P.M., Li X., Kawanabe Y., Zhou J. (2003) Native polycystin 2 functions as a plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol* 23(7): 2600-2607
- Machleidt T., Robers M. and Hanson G.T. (2007) Protein labeling with FIAsh and ReAsH. *Methods Mol Biol* 356: 209-220
- Malone A.M., Anderson C.T., Tummala P., Kwon R.Y., Johnston T.R., Stearns T., Jacobs C.R. (2007) Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33): 13325-13330

- Marshall W.F. and Rosenbaum J.L. (2001) Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J Cell Biol* 155(3): 405-414
- Martin A., Hedinger C., Häberlin-Jakob M., Walt H. (1988) Structure and motility of primary cilia in the follicular epithelium of the human thyroid. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 55(3): 159-166
- Martin B.R., Giepmans B.N., Adams S.R. and Tsien R.Y. (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol* 23(10): 1308-1314
- McCutchan J.H. and Pagano J.S. (1968) Enhancement of the infectivity of Simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Nat Cancer Inst* 41: 351-356
- McDonald K. (1999) High-pressure freezing for preservation of high resolution fine structure and antigenicity for immunolabeling. *Methods Mol Biol* 117: 77-97
- McDonald K.L. and Auer M. (2006) High-pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques* 41(2): 137, 139, 141 passim.
- McDonald K.L. and Webb R.I. (2011) Freeze-substitution in 3 hours or less. *J Microsc* 243(3): 227-233
- McGlashan S.R., Haycraft C.J., Jensen C.G., Yoder B.K., Poole C.A. (2007) Articular cartilage and growth plate with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737orpk mice lacking the primary cilia protein Polaris. *Matrix Biol* 26(4): 234-246
- Meisslitzer-Ruppitsch C., Prikowitsch T., Neumüller J., Pavelka M. and Ellinger A. (2010) Correlative light and electron microscopic exploration of endocytic organelles. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*; A. Méndez-Vilas and J. Diaz (Eds.): 277-285
- Michaud E.J. and Yoder B.K. (2006) The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer Res* 66(13): 6463-6467
- Milenkovic L., Scott M.P., Rohatgi R. (2009) Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol* 187(3): 365-374
- Möbius W. (2009) Cryopreparation of biological specimens for immunoelectron microscopy. *Ann Anat* 191(3): 231-247
- Mochizuki T., Wu G., Hayashi T., Xenophontos S.L., Veldhuisen B., Saris J.J., Reynolds D.M., Cai Y., Gabow P.A., Pierides A., Kimberling W.J., Breuning M.H., Deltas C.C., Peters D.J.M. and Somlo S. (1996) PKD2 a Gene for Polycystic Kidney Disease That Encodes an Integral Membrane Protein. *Science* 272(5266): 1339-42
- Monosov E.Z., Wenzel T.J., Lüers G.H., Heyman J.a., Subramani S. (1996) Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells. *J Histochem Cytochem* 44(6): 581-589
- Moor H. (1987) Theory and practice of high-pressure freezing. In: *Cryo-techniques in Biological Electron. Microscopy*, ed. by Steinbrecht R.A. and Zierold K., Springer-Verlag, Berlin, 175-191
- Moorman S.J. and Shorr A.Z. (2008) The primary cilium as a gravitational force transducer and a regulator of transcriptional noise. *Dev Dyn* 237(8): 1955-1559
- Morrow I.C., Rea S., Martin S., Prior I.A., Prohaska R., Hancock J.F., James D.E., Parton R.G. (2002) Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem* 277(50): 48834-48841

- Moser J.J., Fritzler M.J., Ou Y., Rattner J.B. **(2010)** The PCM-basal body/primary cilium coalition. *Semin Cell Dev Biol* 21(2): 148-155
- Moyer J.H., Lee-Tischler M.J., Kwon H.Y., Schrick J.J., Avner E.D., Sweeney W.E., Godfrey V.L., Cacheiro N.L., Wilkinson J.E., Woychik R.P. **(1994)** Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 264(5163): 1329-1333
- Mühlfeld C. **(2010)** High-pressure freezing, chemical fixation and freeze-substitution for immune-electron microscopy. *Methods Mol Biol* 611: 87-101
- Murcia N.S., Sweeney W.E. Jr., AVner E.D. **(1999)** New insights into the molecular pathophysiology of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 55(4): 1187-1197
- Murcia N.S., Richards W.G., Yoder B.K., Mucenski M.L., Dunlap J.R., Woychik R.P. **(2000)** The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* 127(11): 2347-2355
- Nachury M.V., Seeley E.S. and Jin H. **(2010)** Trafficking to the ciliary membrane: how to geht across the periciliary diffusion barrier? *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 59-87
- Nauli S.M., Alenghat F.J., Luo Y., Williams E., Vassilev P., Li X., Elia A.E., Lu W., Brown E.M., Quinn S.J., Ingber D.E., Zhou J. **(2003)** Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33(2): 129-37
- Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S., Harada A., Kanai Y., Kido M., Hirokawa N. **(1998)** Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95(6): 829-837
- Obermüller N., Gallagher A.R., Cai Y., Gassler N., Gretz N., Somlo S., Witzgall R. **(1999)** The rat pkd2 protein assumes distinct subcellular distribution in different organs. *Am J Physiol* 277(6 Pt 2): F914-925
- Obermüller N., Cai Y., Kränzlin B., Thomson R.B., Gretz N., Kriz W., Somlo S., Witzgall R. **(2002)** Altered expression pattern of polycystin-2 in acute and chronic renal tubular diseases. *J Am Soc Nephrol* 13(7): 1855-1864
- Ocbina P.J., Eggenschwiler J.T., Moskowitz I., Anderson K.V. **(2011)** Complex interactions between genes controlling trafficking in primary cilia. *Nat Genet* 43(6): 547-553
- Olins A.L., Olins D.E., Levy H.A., Margle S.M., Tinnel E.P., Durfee R.C. **(1989)** Tomographic reconstruction from energy-filtered images of thick biological sections. *J Microsc* 154(3): 257-265
- Omori Y., Zhao C., Saras A., Mukhopadhyay S., Kim W., Furukawa T., Sengupta P., Veraksa A., Malicki J. **(2008)** *elipsa* is an early determinant of ciliogenesis that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase Rab8. *Nat Cell Biol* 10(4): 437-444
- Ong A.C., Ward C.J., Butler R.J., Biddolph S., Bowker C., Torra R., Pei Y., Harris P.C. **(1999)** Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol* 154(6): 1721-1729
- Ong A.C. and Harris P.C. **(2005)** Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex. *Kidney Int* 76(4): 1234-1247
- Orozco J.T., Wedaman K.P., Signor D., Brown H., Rose L., Scholey J.M. **(1999)** Movement of motor and cargo along cilia. *Nature* 398(6729):674
- Ou G., Blacque O.E., Snow J.J., Leroux M.R., Scholey J.M. **(2005)** Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* 436(7050): 583-587
- Paintrand M., Moudjou M., Delacroix H., Bornens M. **(1992)** Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* 108(2): 107-128



- Pan J., Wang Q., Snell W.J. (2005) Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab Invest* 85(4): 452-463
- Pan J. and Snell W. (2007) The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* 129(7): 1255-1257
- Papernaster D.S., Schneider B.G. and Besharse J.C. (1985) Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. Ultrastructural immunocytochemical and autoradiographic evidence in *Xenopus* retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(10): 1386-1404
- Papernaster D.S., Schneider B.G., DeFoe D., Besharse J.C. (1986) Biosynthesis and vectorial transport of opsin on vesicles in retinal rod photoreceptors. *J Histochem Cytochem* 34(1): 5-16
- Paterson A.D. and Pei Y. (1998) Is there a third gene for autosomal dominant polycystic kidney disease? *Kidney Int* 54(5): 1759-1761
- Paterson A.D. and Pei Y. (1999) PKD3 – to be or not to be? *Nephrol Dial Transplant* 14(12): 2965-2966
- Pazour G.J., Baker S.A., Deane J.A., Cole D.G., Dickert B.L., Rosenbaum J.L., Witman G.B., Besharse J.C. (2002) The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J Cell Biol* 157(1): 103-113
- Pazour G.J., Dickert B.L., Vucica Y., Seeley E.S., Rosenbaum J.L., Witman G.B., Cole D.G. (2000) Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151(3): 709-718
- Pazour G.J., San Augustin J.T., Follit J.A., Rosenbaum J.L., Witman G.B. (2002) Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* 12(11): R378-380
- Pazour G.J., Witman G.B. (2003) The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol* 15(1): 105-110
- Pazour G.J. (2004) Intraflagellar Transport and Cilia-Dependent Renal Disease: The Ciliary Hypothesis of Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 15: 2528-2536
- Pedersen L.B., Veland I.R., Schrøder J.M., Christensen S.T. (2008) Assembly of primary cilia. *Dev Dyn* 237(8): 1993-2006
- Pei Y., Watnick T., He N., Wang K., Liang Y., Parfrey P., Germino G., St George-Hyslop P. (1999) Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a “two-hit” model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 10(7): 1524-1529
- Perkins L.A., Hedgecock E.M., Thomson J.N., Culotti J.G. (1986) Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 117(2): 456-487
- Peters D.J. and Sandkuijl L.A. (1992) Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. *Contrib Nephrol* 97: 128-139
- Petri E.T., Celic A., Kennedy S.D., Ehrlich B.E., Boggon T.J., Hodson M.E. (2010) Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of polycystin-2 channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20): 9176-9181
- Pigino G., Geimer S., Lanzavecchia S., Paccagnini E., Cantele F., Diener D.R., Rosenbaum J.L., Lupetti P. (2009) Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains in situ. *J Cell Biol* 187(1): 135-148
- Piperno G. and Mead K. (1997) Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of Chlamydomonas flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4457-4462

- Pitelka D.R. (1974) Basal bodies and root structures. In *Cilia and Flagella*. M.A. Sleight. Editor, Academic press, Inc., New York: 437-464
- Praetorius H.A. and Spring K.R. (2005) A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* 67: 515-529
- Qian F. and Germino G.G. (1997) "Mistakes happen": somatic mutation and disease. *Am J Hum Genet* 61: 1000-1005
- Qian F., Watnick T.J., Onuchic L.F., Germino G.G. (1996) The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87(6): 979-987
- Qin H., Rosenbaum J.L., Barr M.M. (2001) An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in *C. elegans* ciliated sensory neurons. *Curr Biol* 11(6): 457-461
- Qin H., Diener D.R., Geimer S., Cole D.G., Rosenbaum J.L. (2004) Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J Cell Biol* 164(2): 255-266
- Qin H., Burnette D.T., Bae Y.K., Forscher P., Barr M.M., Rosenbaum J.L. (2005) Intraflagellar transport is required for the vectorial movement of TRPV channels in the ciliary membrane. *Curr Biol* 15(18): 1695-1699
- Quintana C. (1994) Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for ultrastructural, immunocytochemical and microanalytical studies. *Micron*. 25(1): 63-99
- Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L., Jacobson K. (2002) Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat Cell Biol* 4(4): 286-293
- Reimer L., Rennekamp R., Fromm I., Langenfeld M. (1991) Contrast in the electron spectroscopic imaging mode of a TEM. IV. Thick specimens imaged by the most-probable energy loss. *J Microsc* 162(1): 3-14
- Reiter J.F. and Mostov K. (2006) Vesicle transport, cilium formation, and membrane specialization: the origins of a sensory organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49): 18383-18384
- Reynolds E.S. (1963) The Use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
- Rez P. (2003) Comparison of phase contrast transmission electron microscopy with optimized scanning transmission annular dark field imaging for protein imaging. *Ultramicroscopy* 96(1): 117-124
- Richardson K.C., Jarett L., Finke E.H. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathinsectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35: 313-23
- Rieder C.L., Jensen C.G. and Jensen L.C. (1979) The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *J Ultrastruct Res* 68(2): 173-185
- Ringo D.L. (1967) Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 33(3): 543-571
- Ripper D., Schwarz H. and Stierhof Y.D. (2008) Cryo-section immunolabeling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration. *Biol Cell* 100(2): 109-123
- Robinson D.S.F., Melo J.V., Andrews C., Scheys A. und Catovsky D. (1985) Intracytoplasmic inclusions in B prolymphocytic leukaemia: ultrastructural, cytochemical and immunological studies. *J clin Path*, 38: 897-903
- Rosenbaum J.L. and Child F.M. (1967) Flagellar regeneration in protozoan flagellates. *J Cell Biol* 34(1): 345-364

- Rosenbaum J.L. and Witman G.B. (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(11): 813-825
- Rossetti S., Strmecki L., Gamble V., Burton S., Sneddon V., Peral B., Roy S., Bakkaloglu A., Komel R., Winearls C.G., Harris P.C. (2001) Mutation analysis of the entire *PKD1* gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 68(1): 46-63
- Rothman J.E. and Fine R.E. (1980) Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(2): 780-784
- Salecker B. (2010) Räumliche Rekonstruktion und Visualisierung auf der Basis von elektronenmikroskopischen Daten (Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg)
- Satir P. and Christensen S.T. (2007) Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69: 377-400
- Satir P., Pedersen L.B. and Christensen S.T. (2010) The primary cilium at a glance. *J Cell Sci* 123(Pt4): 499-503
- van Schack M.L., Fakan S., Villiger W., Müller M. (1993) Cryofixation and cryosubstitution: a useful alternative in the analyses of cellular fine structure. *Eur J Histochem* 37(1): 5-18
- Schägger H. und von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2): 368-379
- Scheffers M.S., Le H., van der Bent P., Leonhard W., Prins F., Spruit L., Breuning M.H., de Heer E., Peters D.J. (2002) Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells. *Hum Mol Genet* 11(1): 59-67
- Scholey J.M. (2003) Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 423-443
- Scholey J.M. (2008) Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J Cell Biol* 180(1): 23-29
- Schuck S. and Simons K. (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117: 5955-5964
- Sedmak T. and Wolfrum U. (2010) Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of retina. *J Cell Biol* 189(1): 171-186
- Seeley E.S. and Nachury M.V. (2010) The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J Cell Sci* 123(Pt 4): 511-518
- Shimomura O., Johnson F.H. and Saiga Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239
- Shimomura O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217(Pt 1): 1-15
- Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. (2011) A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol* 9(4): e1001041
- Singla V. and Reiter J.F. (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313(5787): 629-633
- Sloboda R.D. and Rosenbaum J.L. (2007) making sense of cilia and flagella. *J Cell Biol* 179(4): 575-582
- Sluder G. (2005) Two-way traffic: centrosomes and the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(9): 743-748

- Sohara E., Luo Y., Zhang J., Manning D.K., Beier D.R., Zhou J. **(2008)** Nek8 regulates the expression and localization of polycystin-1 and polycystin-2. *J Am Soc Nephrol* 19(3): 469-476
- Somlo S. and Ehrlich B. **(2001)** Human disease: Calcium signaling in polycystic kidney disease. *Curr Biol* 11: R356-R360
- Sorokin S. **(1962)** Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 15: 363-377
- Sosinsky G.E., Crum J., Jones Y.Z., Lanman J., Smarr B., Terada M., Martone M.E., Deerinck T.J., Johnson J.E., Ellisman M.H. **(2008)** The combination of chemical fixation procedures with high pressure freezing and freeze substitution preserves highly labile tissue ultrastructure for electron tomography applications. *J Struct Biol* 161(3): 359-371
- Sotelo J.R. and Trujillo-Cenóz O. **(1958)** Electron microscope study on the development of ciliary components of the neutral epithelium of the chick embryo. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 49(1): 1-12
- Sousa A.A., Azari A.A., Zhang G., Leapman R.D. **(2011)** Dual-axis electron tomography of biological specimens: Extending the limits of specimen thickness with bright-field STEM imaging. *J Struct Biol* 174(1): 107-114
- Stein O., Stein Y. **(1971)** Light and electron microscopic radioautography of lipids: technique and biological applications. *Adv Lipid Res*, 9: 1
- Stierhof Y.D. and El Kasmi F. **(2010)** Strategies to improve the antigenicity, ultrastructure preservation and visibility of trafficking compartments in *Arabidopsis* tissue. *Eur J Cell Biol* 89(2-3): 285-297
- Streets A.J., Moon D.J., Kane M.E., Obara T., Ong A.C. **(2006)** Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 *in vivo* and *in vitro*. *Hum Mol Genet* 15(9): 1465-1473
- Studer D., Michel M. and Müller M. **(1989)** High pressure freezing comes of age. *Scanning Microsc Suppl* 3: 253-268; discussion 268-269
- Surrey T., Elowitz M.B., Wolf P.E., Yang F., Nédélec F., Shokat K., Leibler S. **(1998)** Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4293-4298
- Tachi S., Tachi C. and Lindner H.R. **(1974)** Influence of ovarian hormones on formation of solitary cilia and behavior of the centrioles in uterine epithelial cells of the rat. *Biol Reprod* 10(4): 391-403
- Taulman P.D., Haycraft C.J., Balkovetz D.F., Yoder B.K. **(2001)** Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 12(3): 589-599
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium **(1995)** Polycystic kidney disease: the complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 81(2): 289-298
- Tobin J.L. and Beales P.L. **(2007)** Bardet-Biedl syndrome: beyond the cilium. *Pediatr Nephrol* 22(7): 926-936
- Torikata C. **(1988)** The ciliary necklace – a transmission electron microscopy study using tannic acid-containing fixation. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 101(2-3): 210-214
- Tour O., Meijer R.M., Zacharias D.A., Adams S.R., Tsien R.Y. **(2003)** Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat Biotech* 21:1505-1508
- Tucker R.W., Pardee A.B. and Fujiwara K. **(1979)** Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* 17(3): 527-535

- Tyler K.M., Fridberg A., Toriello K.M., Olson C.L., Cieslak J.A., Hazlett T.L., Engman D.M. (2009) Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J Cell Sci* 122(Pt 6): 859-866
- Vieira O.V., Gaus K., Verkade P., Fullekrug J., Vaz W.L., Simons K. (2006) FAPP2, cilium formation, and compartmentalization of the apical membrane in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49): 18556-18561
- Walther P und Ziegler A. (2002) Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water. *J Microsc* 208(1): 3-10
- Watnick T., He N., Wang K., Liang Y., Parfrey P., Hefferton D., St George-Hyslop P., Germino G., Pei Y. (2000) Mutations of PKD1 in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations. *Nat Genet* 25(2): 143-144
- Watnick T. and Germino G. (2003) From cilia to cyst. *Nat Genet* 34(4): 355-356
- Webber W.A. and Lee J. (1975) Fine structure of mammalian renal cilia. *Anat Rec* 182(3): 339-343
- van de Weyer P.S. (2008) Die Rolle des primären Ziliums im kanonischen Wnt-Signalweg. (Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau)
- Weiss R.L., Goodenough D.A., and Goodenough U.W. (1977) membrane particle arrays associated with the basal body and with contractile vacuole secretion in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* 72(1): 133-143
- Westlake C.J., Baye L.M., Nachury M.V., Wrigth K.J., Ervin K.E., Phu L., Chalouni C., Beck J.S., Kirkpatrick D.S., Slusarski D.C., Sheffield V.C., Scheller R.H., Jackson P.K. (2011) Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPII) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7): 2759-2764
- Wheatley D.N. (2005) Landmarks in the first hundred years of primary (9+0) cilium research. *Cell Biol Int* 29(5):333-339
- Wheatley D.N. (1995) Primary cilia in normal and pathological conditions: a review. *Pathobiology* 63(4): 222-238
- Wheatley D.N. (1982) The centriole: a central enigma of cell biology. North Holland, Amsterdam: Elsevier
- Wilson P.D., Devuyst O., Li X., Gatti L., Falkenstein D., Robinson S., Fambrough D., Burrow C.R. (2000) Apical plasma membrane mispolarization of NaK-ATPase in polycystic kidney disease epithelia is associated with aberrant expression of the beta2 isoform. *Am J Pathol* 156(1): 253-268
- Wilson P.D. (2004) Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 350: 151-164
- Wolfrum U. and Schmitt A. (2000) Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 46(2): 95-107
- Wu G., D'Agati V., Cai Y., Markowitz G., Park J.H., Reynolds D.M., Maeda Y., Le T.C.; Hou H.Jr., Kucherlapati R., Edelmann W., Somlo S. (1998) Somatic inactivation of PKD2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93(2): 177-88
- Xiao Z., Zhang S., Mahlios J., Zhou G., Magenheimer B.S., Guo D., Dallas S.L., Maser R., Calvet J.P., Bonewald L., Quarles L.D. (2006) Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* 281(41): 30884-30895

- Yakushevska A.E., Lebbink M.N., Geerts W.J., Spek L., van Donselaar E.G., Jansen K.A., Humbel B.M., Post J.A., Verkleij A.J., Koster A.J. **(2007)** STEM tomography in cell biology. *J Struct Biol* 159(3): 381-391
- Yamamoto M. and Kataoka K. **(1986)** Electron microscopic observation of the primary cilium in the pancreatic islets. *Arch Histol Jpn* 49(4): 449-457
- Yang J., Liu X., Yue G., Adamian M., Bulgakov O., Li T. **(2002)** Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J Cell Biol* 159(3): 431-440
- Yang J., Gao J., Adamian M., Wen X.H., Pawlyk B., Zhang L., Sanderson M.J., Zuo J., Makino C.L., Li T. **(2005)** The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol Cell Biol* 25(10): 4129-4137
- Yoder B.K., Hou X., Guay-Woodford L.M. **(2002)** The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are colocalized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13(10): 2508-16
- Yoder B.K., Mulroy S., Eustace H., Boucher C. and Sandford R. **(2006)** Molecular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 8: 1-22
- Yoder B.K. **(2007)** Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18(5): 1381-1388
- Zhang Q., Murcia N.S., Chittenden L.R., Richards W.G., Michaud E.J., Woychik R.P., Yoder B.K. **(2003)** Loss of the tg737 protein results in skeletal patterning defects. *Dev Dyn* 227(1): 78-90
- Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L. **(1996)** trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* 85(5): 661-671
- Zimmermann K.W. **(1898)** Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. *Arch Mikrosk Anat* 52: 552-706

---

## VIII Publikationen

- Hoffmeister H., Babinger K., Gürster S., Cedzich A., Meese C., Schadendorf K., Osten L., de Vries U., Rasche A., Witzgall R. **(2011)** Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane. *J Cell Biol* 192(4): 631-645
- Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gürster S., Heimerl T., Wasserburger N., Burghardt T., Küper U., Bellack A., Schopf S., Wirth R., Huber H und Wanner G. **(2010)** Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy. *Meth Cell Biol* 96: 47-69
- Strauch U.G., Grunwald N., Obermeier F., Gürster S., Rath H.C. **(2010)**. Loss of CD103+ intestinal dendritic cells during colonic inflammation. *World J Gastroenterol* 16(1):21-9
- Müller D.W., Meyer C., Gürster S., Küper U., Huber H., Rachel R., Wanner G., Wirth R., Bellack A. **(2009)**. The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *J Bacteriol* 191(20): 6465-8
- Burghardt T., Saller M., Gürster S., Müller D., Meyer C., Jahn U., Hochmuth E., Deutzmann R., Siedler F., Babinger P., Wirth R., Huber H., Rachel R. **(2008)**. Insight into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins. *Arch Microbiol* 190(3): 379-94
- Strauch U.G., Obermeier F., Grunwald N., Gürster S., Dunger N., Schultz M., Giese D.P., Mähler M., Schölmerich J., Rath H.C. **(2005)**. Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T-cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* 54: 1546-1552

## IX Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Sonja Gürster  
 geboren am: 20.06.1978 in Regen  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch

### Schulbildung

1984 - 1988 Grundschole Teisnach  
 1988 - 1997 Dominicus-von-Linprun Gymnasium Viechtach

### Berufsausbildung

1997 - 1999 Chemieschule Dr. Erwin Elhardt in München  
 ▪ staatlich geprüfte chemisch-technische Assistentin

### Berufserfahrung

2000 - 2005 Klinikum der Universität Regensburg  
 ▪ Medizinisch-technische Assistentin  
 seit August 2011 TEM-/SEM-Applikationsspezialistin bei JEOL (Germany) GmbH

### Hochschulbildung

#### Universität Regensburg

2001 - 2007 Studium der Biologie und Diplomarbeit mit dem Thema „*Nanoarchaeum equitans*: Versuche zur Reindarstellung und strukturelle und proteinbiochemische Charakterisierung“ unter der Betreuung von PD Dr. R. Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Zentrum für Elektronenmikroskopie

### Promotion

#### Universität Regensburg

2007 - 2012 Promotion mit dem Thema "Intrazellulärer Transport von Zilium-assoziierten Proteinen" unter der Betreuung von Prof. Dr. Ralph Witzgall, Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

...meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Ralph Witzgall** für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme an Ihrem Institut.

...Herrn **Prof. Reinhard Rachel** danke ich für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Seine zahlreichen konstruktiven Anregungen und Ideen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich stets zur Realisierung eigener Ideen motiviert. Danke für alle Mittel und Freiheiten und die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

...Frau Prof. Margit Pavelka & Herrn Prof. Josef Neumüller am Institut für Histologie und Embryologie im Zentrum für Anatomie und Zellbiologie an der Medizinischen Universität in Wien.

...Guido Gaietta, Ken Henry & Tom Deerinck (NCMIR, UCSD) für den 2-wöchigen Aufenthalt unter der Sonne Kaliforniens in San Diego zur Erlernung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie mittels ReAsH.

...der Arbeitsgruppe um Prof. Carsten Hoffmann am Lehrstuhl für Pharmakologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg für die ersten Schritte der Etablierung der *in-vivo*-FIAsH-Staining-Methode.

Einen wesentlichen Teil dieser Arbeit habe ich den technischen Assistentinnen am Lehrstuhl zu verdanken: ...allen voran **Christine Meese**, die eine großartige Arbeit geleistet hat; Karin Schadendorf für die Anfertigung vieler vieler Ultra- und Semidünnschnitte, und auch Helga Schmidt & Conny Niemann, die ebenfalls immer zur Stelle waren, wenn es brannte; Larissa Osten für ihre Zauberhände bei den Klonierungsarbeiten und natürlich allen anderen... sind ja so viele.

...meinem Doktorarbeits-Nachfolger **Benjamin Salecker** möchte ich für seine unermüdliche Unterstützung bei computertechnischen Problemen danken. Er betreute auch die HiWi-Studenten Caro, Sebastian & Niklas, denen ich für die zeitintensive Erstellung der 3D-Modelle danken möchte.

Auch den beiden Bachelor-Studentinnen Vroni Wirth & Johanna Hausberger gebührt ein Lob für ihre Arbeiten.

...den vielen vielen Wegbegleitern: ...allen voran **Dr. Andreas „Flash“ Klingl**, der auch nachdem sich unsere universitären Wege trennten immer ein offenes Ohr hatte und mich beim Beenden der mühsamen Schreibarbeit tatkräftig unterstützte...Danke für die Arschritte! Dann natürlich **Dr. Carolin Meyer**, ohne die Kaffee, Zigaretten und Schokolade nur noch halb so gut schmeckten; Auch Dr. Tillmann Burghardt, Dr. Jürgen Kastner & Dr. Anne-Sarah Raschta möchte ich für die Freundschaft und vielen wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen danken – Danke für die tolle Zeit!

Allen nachfolgenden Doktoranden Jennifer Flechsler, Thomas Heimerl, Denise Schmied, Susanne Baumgarten & Natalya Lukajczyk,... wünsche ich viel Erfolg und bewahrt Euch Euren Optimismus.

Herzlichen Dank an alle Mitglieder der beiden Lehrstühle, der Anatomie und auch der Mikrobiologie, die meine Arbeit immer unterstützten und so überhaupt möglich gemacht haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner **Familie** und allen **Freunden** danken, die mich im Verlauf meines Studiums und während dieser Arbeit immer mit voller Kraft unterstützt und motiviert haben. Danke, ihr wart, seid & bleibt immer mein Rückhalt!

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sonja Gürster, geboren am 20.06.1978 in Regen, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

### **„ Intrazellulärer Transport von Zilium-assoziierten Proteinen“**

von mir selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Erding, Februar 2013

---

(Sonja Gürster)